

Kênia Soares de Souza

**Hormônio alfa-melanócito estimulante melhora a cicatrização de feridas
cutâneas em camundongos**

Belo Horizonte

Janeiro/2013

Kênia Soares de Souza

**Hormônio alfa-melanócito estimulante melhora a cicatrização de feridas
cutâneas em camundongos**

Dissertação apresentada ao Departamento de Morfologia,
Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de
Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do
grau de Mestre em Biologia Celular.

Orientadora: Cláudia Rocha Carvalho

Colaboradores: Geraldo Magela de Azevedo Júnior

Claudiney Melquíades Rodrigues

Raquel Alves Costa

Nelson Monteiro Vaz

Belo Horizonte

Janeiro/2013

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia do Sistema Linfóide e Regeneração com o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)



ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE
KÊNIA SOARES DE SOUZA

228/2013/01
entrada
1º/2011
2011667610

Às **nove horas** do dia **31 de janeiro de 2013**, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Dissertação, indicada pelo Colegiado de Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "**HORMÔNIO ALFA-MELANÓCITO ESTIMULANTE MELHORA A CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS EM CAMUNDONGOS**", requisito final para obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular, área de concentração: **Biologia Celular**. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, **Dra. Cláudia Rocha Carvalho**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dra. Cláudia Rocha Carvalho	UFMG	Aprovada
Dra. Paula Peixoto Campos Lopes	UFMG	Aprovada
Dr. Gregory Thomas Kitten	UFMG	aprovado

Pelas indicações, a candidata foi considerada: APROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. **Belo Horizonte, 31 de janeiro de 2013.**

Dra. Cláudia Rocha Carvalho (Orientadora) Cláudia Rocha Carvalho

Dra. Paula Peixoto Campos Lopes Paula Peixoto Campos Lopes

Dr. Gregory Thomas Kitten Gregory T. Kitten

Coliveiro
Prof. Cleida Aparecida de Oliveira
COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO
EM BIOLOGIA CELULAR TCB/UFMG

Obs: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador

Dedico este trabalho à *vida*, algo tão surpreendente e misterioso que tentamos insistentemente decifrar e compreender durante toda nossa existência, mas que poucos têm a oportunidade de reescrever...

“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo.”

Albert Einstein

"O modo de olhar e as conversações que guiam esse olhar configuram o que se vê ... Ainda mais, o modo de olhar não apenas determina o que se vê e se faz, mas também determina o que se pergunta e o que se explica".

Humberto Maturana

AGRADECIMENTOS

À minha família, fonte de toda minha força e determinação. Aos meus pais, Heli e Maria, irmãos Franklin e Ronnie, cunhadas Cláudia e Claudiméia, e namorado Gladison, obrigada pelas palavras de incentivo e apoio incondicional, por me levantarem e me carregarem quando eu não conseguia mais caminhar... Devo a vocês os passos que me conduziram até aqui.

Aos meus sobrinhos, Guilherme, Thaís e Gustavo, por recarregarem minha energia a cada semana e me proporcionarem momentos de muita alegria e de descontração.

Aos meus primos Fabrícia e Filipe e tia Nedite por estarem sempre ao meu lado, me incentivando e torcendo pelo meu sucesso.

Aos meus amigos Alessandro, Alessandra, Luana e Monalisa por me ajudarem desde os primeiros desafios, ouvirem minhas lamúrias e me fazerem acreditar que amanhã tudo será melhor...

À professora Cláudia Rocha Carvalho por me receber em seu laboratório sem restrições, conviver com minha inexperiência e direcionar pacientemente minha formação científica, mas mais do que isso, por me mostrar que o conhecimento não traz consigo a arrogância, o egocentrismo e a indelicadeza.

Ao professor Nelson Monteiro Vaz por destravar meu modo de pensar me ajudando a entender o que não está escrito nas linhas e entrelinhas de um livro ou artigo. Por me ensinar a caminhar em sentido oposto ao das idéias acostumadas ampliando minha capacidade de ver o que está lá, mas é percebido por poucos...

Ao caro amigo Daniel Almeida Galdino, que apesar do pouco tempo de convívio, sempre me disse as palavras certas nas horas certas. Obrigada pelo incentivo e disponibilidade em ajudar. Aos grandes amigos Geraldo Magela de Azevedo Junior, Claudiney Melquíades Rodrigues, Thiago Cantaruti Anselmo e Raquel Alves Costa pela disponibilidade e paciência de cada um em compartilhar comigo o conhecimento que adquiriu durante anos de estudos. De cada um de vocês pude extrair diferentes ensinamentos que contribuíram de maneira crucial para o

desenvolvimento deste trabalho e de minha formação científica. Além disso, obrigada pelos momentos que passamos juntos, nos quais sorrimos, nos estressamos, nos surpreendemos, nos emocionamos... enfim fizemos da construção da ciência algo mais humano.

À Mariana Resende, pela paciência em me ajudar a dar meus primeiros passos em direção ao desenvolvimento deste trabalho e, mesmo de longe, torcer pelo meu sucesso.

Aos amigos do antigo Laboratório N3-140 pela companhia e palavras de incentivo.

RESUMO

Feridas de pele em mamíferos adultos geralmente resultam numa cicatriz com a substituição do tecido original por matriz extracelular rica em colágeno, mas em embriões é frequente a regeneração do tecido original. A ausência ou diminuição do infiltrado inflamatório na lesão tem sido correlacionada com maior ocorrência de regeneração ou uma melhora da cicatrização. O Hormônio Alfa-Melanócito Estimulante (α -MSH) é produzido no sistema nervoso central e também por células do sistema imune ou na pele e um dos seus efeitos é estimular a síntese de eumelanina. A ação do α -MSH ocorre por meio de sua ligação aos receptores de melanocortinas (MC-R), expressos em diferentes células da pele, além de macrófagos, mastócitos e linfócitos T. A proteína agouti é um antagonista dos MC-R1 e MC-R4 e sua ligação a estes receptores na pele inibe a produção da eumelanina. O α -MSH também tem amplos efeitos anti-inflamatórios e pode inibir a síntese de citocinas, tais como IL-1, TNF- α , IFN- γ ou mediadores inflamatórios tais como, prostaglandinas e histamina. Testamos se a injeção intraperitoneal de α -MSH ou de agouti, 30 minutos antes da realização de lesões cutâneas em camundongos C57BL/6 adultos alteram o infiltrado leucocitário e a deposição de matriz extracelular no dias 3 e 40 após a lesão. A administração de 125mg/kg da proteína agouti não alterou o número (média \pm SEM) de leucócitos (agouti $4,12 \pm 0,28$ vs controle $4,64 \pm 0,34$) e de mastócitos (agouti $11,0 \pm 1,22$ vs controle $9,5 \pm 0,95$) no terceiro dia após a lesão. Também não alterou significativamente a área da cicatriz medida 40 dias após a lesão, seja macroscopicamente (agouti $11,78 \pm 0,48$ vs controle $12,92 \pm 1,05$) ou microscopicamente (agouti $0,30 \pm 0,03$ vs controle $0,33 \pm 0,02$). Entretanto a administração de 1,0 mg/kg de α -MSH reduziu significativamente o número de leucócitos (α -MSH $2,05 \pm 0,06$ vs controle $4,64 \pm 0,34$) e mastócitos (α -MSH $5,5 \pm 0,27$ vs controle $9,5 \pm 0,95$) 3 dias após realização da lesão e a área de cicatriz medida macroscopicamente (α -MSH $9,24 \pm 0,65$ vs controle $12,92 \pm 1,05$) e microscopicamente (α -MSH $0,22 \pm 0,01$ vs controle $0,33 \pm 0,02$) 40 dias após a mesma. A injeção de α -MSH resultou em uma melhor organização das fibras colágenas e um aumento da quantidade de colágeno III (α -MSH $0,78 \pm 0,1$ vs controle $0,51 \pm 0,06$) sem alterar a quantidade de colágeno I (α -MSH $0,55 \pm 0,05$ vs controle $0,60 \pm 0,1$) 40 dias após a lesão.

Palavras chaves: Reparo de feridas, cicatrização, hormônio alfa-melanócito estimulante, neuropeptídeos, inflamação

ABSTRACT

Skin wound healing in adult mammals frequently result in scar tissue formation where collagen replaces the original tissue, whereas wound closure in fetal skin heals with regeneration of the original tissue. Reduction or alteration in the inflammatory cell composition after wound has been correlated with regeneration or reduction of scar tissue formation. Alpha-melanocyte stimulating hormone (α -MSH) is produced in the central nervous system as well as by immune cells or in the skin where it can stimulate eumelanin production. The action of α -MSH is mediated by melanocortins receptors (MC-R1 and MC-R4) expressed on skin cells, macrophages, mast cells and T-lymphocytes. Agouti is one antagonist of MC-R1 and MC-R4 and binding of agouti to these skin receptors inhibits eumelanin production. Alpha-MSH also has broad anti-inflammatory effects inhibiting the production of pro-inflammatory cytokines, prostaglandins and histamine. We tested if the intraperitoneal injection of α -MSH or agouti, 30 minutes before skin lesion in C57BL/6 adult mice, would alter the inflammatory infiltrate and extracellular matrix deposition as observed 3 and 40 days after lesion. The injection of 125 mg/Kg of agouti did not change leukocyte (mean \pm SEM - agouti $4,12 \pm 0,28$ vs control $4,64 \pm 0,34$) or mast cell (agouti $11,0 \pm 1,22$ vs control $9,5 \pm 0,95$) numbers 3 days after the lesion. Nor did the injection of agouti change scar area measured macroscopically (agouti $11,78 \pm 0,48$ vs control $12,92 \pm 1,05$) or microscopically (agouti $0,30 \pm 0,03$ vs control $0,33 \pm 0,02$) 40 days after the lesion. However, the injection of 1,0 mg/kg of α -MSH significantly reduced leukocyte (α -MSH $2,05 \pm 0,06$ vs control $4,64 \pm 0,34$) and mast cell (α -MSH $5,5 \pm 0,27$ vs control $9,5 \pm 0,95$) counts 3 days after the lesion and also reduced scar area 40 days after the lesion measured either macroscopically (α -MSH $9,24 \pm 0,65$ vs control $12,92 \pm 1,05$) or microscopically (α -MSH $0,22 \pm 0,01$ vs control $0,33 \pm 0,02$). In addition, α -MSH injection resulted in better collagen deposition, increased collagen III (α -MSH $0,78 \pm 0,1$ vs control $0,51 \pm 0,06$) without alteration in collagen I (α -MSH $0,55 \pm 0,05$ vs control $0,60 \pm 0,1$), 40 days after the lesion.

Keywords: wound repair, alpha-melanocyte stimulating hormone, neuropeptide, inflammation

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH – Hormônio adrenocorticotrófico

cAMP – Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico

CD86 – Proteína coestimulatória expressa em células apresentadoras de antígenos

ICAM-1 – Molécula de adesão intercelular 1

IFN- γ – Interferon gama

I κ B α - Inibidor do fator nuclear kappa-B alfa

IL-1 β – Interleucina 1 beta

IL-10 – Interleucina 10

i.p. – Intraperitonal

ISAPS – Sociedade Internacional de Cirurgia Plástica Estética

Kit^{w/w-v} – Camundongos deficientes em mastócitos

Kit^{+/+} – Camundongos selvagens, os quais possuem mastócitos

MC-R – Receptor de melanocortinas

MEC – Matriz extracelular

NF- κ β – Fator de transcrição denominado fator nuclear kappa B

PBS – Salina tamponada com fostafo

PC1 – Enzima prohormônio convertase 1

PC2 – Enzima prohormônio convertase 2

POMC – Pro-opiomelanocortina

SBCP – Sociedade Brasileira de Cirurgia Plástica

TGF- β 1 – Fator de crescimento transformante beta 1

TGF- β 3 – Fator de crescimento transformante beta 3

Th17 – Células T helper efectoras produtoras de interleucina 17

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

VCAM – Molécula de adesão de células vascular

α -SMA – Alfa-actina de músculo liso

α -MSH – Hormônio alfa-melanócito estimulante

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Protocolo experimental.....	30
Figura 2 - Esquema de realização da ferida excisional na pele do dorso de camundongos	31
Figura 3 - Coleta da área contendo a ferida cutânea 3 dias após sua realização	33
Figura 4 - Coleta da área contendo a ferida cutânea 40 dias após sua realização	33
Figura 5 - Retículo utilizado para análises morfométricas	38
Figura 6 - Injeção de 1,0mg/kg de α -MSH diminui o número de leucócitos presentes na área da lesão 3 dias após sua realização, enquanto 0,5 mg/kg e 2,5 mg/kg não.....	41
Figura 7 - Injeção de 125 mg/kg de agouti ou 1,0 mg/kg de α -MSH não altera a área das lesões 3 dias após a realização das mesmas	42
Figura 8 - Injeção de 1,0 mg/kg de α -MSH diminui o número de leucócitos na área da lesão 3 dias após sua realização, mas não o de fibroblastos.....	44
Figura 9 - Injeção de 1,0 mg/kg de α -MSH diminui o número de mastócitos na área da lesão 3 dias após sua realização.....	46
Figura 10 - Injeção de 1,0 mg/kg de α -MSH reduz a área de cicatriz, visão macroscópica, 40 dias após a realização da ferida	48
Figura 11 – Re-epitelização 40 dias após a injeção de salina, 1,0 mg/kg de α -MSH ou 125 mg/kg de agouti	50
Figura 12 - A área de cicatriz, visão microscópica, e organização das fibras colágenas 40 dias após a lesão	52
Figura 13 - Injeção de 1,0 mg/kg de α -MSH melhora a deposição das fibras de colágeno 40 dias após realização da lesão	53
Figura 14 - Injeção de 1,0 mg/kg de α -MSH reduz a área de cicatriz, visão microscópica, 40 dias após a realização da ferida.....	54
Figura 15 - Injeção de 1,0 mg/kg de α -MSH não altera a intensidade de colágeno I, mas altera a disposição das fibras na área de cicatriz 40 dias após realização da lesão	56
Figura 16 - Injeção de α -MSH aumenta a intensidade de fluorescência e altera a disposição de fibras colágenas do tipo III na área de cicatriz 40 dias após realização da lesão	57
Figura 17 - Injeção de 1,0 mg/kg de α -MSH ou 125 mg/kg da proteína agouti não altera o número de fibroblastos na área de cicatriz 40 dias após a lesão.....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Grupos experimentais	29
Tabela 2 – Especificações dos anticorpos utilizados na técnica de imunofluorescência indireta.....	36
Tabela 3 – Grupos e anticorpos utilizados.....	36
Tabela 4 – Padronização da dose de α -MSH – análise semiquantitativa	40

SUMÁRIO

1 – REVISÃO DE LITERATURA	16
1.1 – Sobre a pele: um dos órgãos de interface entre corpo e meio ambiente	16
1.2 – O processo de reparo de feridas de pele.....	17
1.3 – Neuropeptídeos e a pele	20
1.4 – Hormônio Alfa-Melanócito Estimulante (α -MSH).....	21
1.5 – A proteína agouti.....	24
2 – JUSTIFICATIVA	26
3 – OBJETIVOS	27
3.1 – Objetivo Geral.....	27
3.2 – Objetivos específicos	27
4 – MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1 – Animais	28
4.2 – Organização e denominação dos grupos experimentais.....	28
4.3 – Injeção de salina 0,9%.....	29
4.4 – Tratamentos experimentais	29
4.5 – Protocolo experimental	30
4.6 – Ferida excisional	30
4.7 – Período pós-operatório	32
4.8 – Período após recuperação cirúrgica	32
4.9 – Coleta da região lesionada e processamento histológico	32
4.10 – Técnica de imunofluorescência indireta.....	35
4.11 – Análise histopatológica qualitativa e quantitativa da área da lesão	36
4.12 – Aquisição de imagens	37
4.13 – Medida da área, em vista macroscópica, da ferida excisional	37
4.14 – Análise morfométrica em microscopia de luz.....	38
4.15 – Análise em microscópio confocal	38

4.16 – Análise estatística dos resultados	39
5 – RESULTADOS	40
5.1 – Padronização da dose do hormônio α -MSH	40
5.2 – Determinação da área macroscópica da lesão	41
5.3 – Determinação do número de leucócitos e fibroblastos presentes na área da lesão 3 dias após a injeção de α -MSH ou proteína agouti.....	43
5.4 – Determinação do número de mastócitos presentes na área da lesão 3 dias após a injeção de α -MSH ou da proteína agouti.	45
5.5 – Determinação macroscópica da área de cicatriz 40 dias após a lesão.....	47
5.6 – Avaliação histopatológica e determinação microscópica da área cicatriz 40 dias após a realização da lesão e injeção de α -MSH ou proteína agouti.	49
5.7 – Avaliação da intensidade de fluorescência e disposição das fibras colágenas do tipo I e III 40 dias após realização da lesão e injeção de α -MSH.	54
5.8 – Determinação do número de fibroblastos presentes na área de cicatriz 40 dias após realização da lesão e injeção de α -MSH ou proteína agouti.	58
6 – DISCUSSÃO	59
7 – CONCLUSÕES.....	65
8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

1 – REVISÃO DE LITERATURA

1.1 – Sobre a pele: um dos órgãos de interface entre corpo e meio ambiente

A pele é um órgão que recobre toda a superfície externa do corpo e permite a interface deste com o meio ambiente (Brodell and Rosenthal 2008). Ela é constituída pela epiderme, uma camada mais superficial, de origem ectodérmica, composta por um epitélio estratificado pavimentoso queratinizado, que pode ser dividido em cinco camadas morfológicamente distintas: córnea, lúcida, granulosa, espinhosa e basal. Ao longo destas camadas são encontradas quatro populações distintas de células: os queratinócitos, presentes em todas as camadas, as células de Langerhans, presentes na camada espinhosa, os melanócitos e as células de Merkel, presentes na camada basal (Gartner and Hiatt 2007; Junqueira and Carneiro 2004; McGrath *et al*, 2008; Pagnano *et al*, 2009).

Logo abaixo da epiderme, localiza-se a derme, uma camada de origem mesodérmica, composta por um tecido conjuntivo denso não modelado, onde se podem encontrar diferentes populações celulares, tais como fibroblastos, macrófagos e mastócitos, entre outras, além de vasos sanguíneos e nervos. Em sua interface com a epiderme pode-se observar a formação de projeções denominadas cristas ou papilas, motivo pelo qual esta camada é chamada de derme papilar. Nesta região encontra-se um tecido conjuntivo frouxo constituído por delgadas fibras de colágeno I, colágeno III e fibras elásticas. Além disso, ligando a epiderme à derme encontram-se fibrilas de ancoragem, constituídas por colágeno do tipo VII. Mais profundamente, abaixo da derme papilar encontra-se a derme reticular formada por espessas fibras de colágeno I e fibras elásticas entrelaçadas, além de proteoglicanos, ricos em dermatan sulfato. Esta região da derme contém estruturas derivadas da epiderme, tais como glândulas sudoríparas, folículos pilosos e glândulas sebáceas (Bensouilah *et al*, 2006; Brodell and Rosenthal 2008; Gartner and Hiatt 2007; Junqueira and Carneiro 2004; McGrath *et al*, 2008).

Abaixo da pele encontra-se a hipoderme ou panículo adiposo, uma camada de tecido conjuntivo frouxo contendo quantidades variáveis de tecido adiposo. Em alguns animais, como camundongos e coelhos, abaixo da hipoderme é possível observar a presença de uma camada vestigial de músculo estriado, denominada panículo carnoso (Darwin 2000; Gartner and Hiatt 2007; Junqueira and Carneiro 2004; McGrath *et al*, 2008; Pagnano *et al*, 2009).

Fisiologicamente a pele é responsável por processos de extrema importância para manutenção do viver, tais como a síntese de vitamina D₃, regulação da temperatura corporal, excreção, proteção contra desidratação e agressões de natureza química, física ou biológica, entre outros (Bensouilah *et al*, 2006; Gartner and Hiatt 2007; Jueira and Carneiro 2004).

1.2 – O processo de reparo de feridas de pele

Diante das importantes funções desempenhadas pela pele a ocorrência de uma lesão que resulte na ruptura de sua integridade física pode acarretar sérias consequências ao organismo. Desse modo um processo de reparo que restabeleça de maneira satisfatória a integridade desse órgão se faz extremamente necessário.

Em mamíferos, o reparo de pele, bem como de outros órgãos, é um processo fisiológico intrincado e bem orquestrado que envolve a secreção de diferentes fatores de crescimento, citocinas, entre outras substâncias (Pagnano *et al*, 2009; Rolfe and Grobbelaar 2012), bem como a participação de variados tipos celulares durante uma coordenada e sobreposta cascata de eventos que podem ser separados em três estágios: hemostasia/inflamação, proliferação e remodelamento (Bielefeld *et al*, 2012; Gurtner *et al*, 2008; Pagnano *et al*, 2009; Schreml *et al*, 2010).

Imediatamente após a ocorrência de uma ferida inicia-se uma série de eventos que inibem o sangramento e impedem a entrada de microorganismos, bem como o extravasamento de plasma e líquido tissular (Bielefeld *et al*, 2012; Rubin *et al*, 2006). Tais eventos englobam a vasoconstrição, ativação da cascata de coagulação, agregação e degranulação de plaquetas e resultam na formação do coágulo de fibrina, o qual, nestes momentos iniciais, atua como uma matriz provisória auxiliando a migração de células inflamatórias (Bielefeld *et al*, 2012; Rubin *et al*, 2006; Satish and Kathju 2010; Schreml *et al*, 2010; Schultz *et al*, 2011). Além de participarem ativamente da formação do coágulo de fibrina, as plaquetas são responsáveis pela liberação de fatores de crescimento e citocinas que atuam na atividade de fibroblastos e fornecem estímulos quimiotáticos para neutrófilos, outros fibroblastos e monócitos (Moulinet *et al*, 1998). A ativação do sistema complemento e produtos da degradação bacteriana também atuam no recrutamento de neutrófilos para o local da ferida (Gurtner *et al*, 2008).

Inicialmente uma resposta inflamatória neutrofílica aguda liquefaz o tecido necrótico (Rubin *et al*, 2006) removendo fragmentos bacterianos ou corpos estranhos que se localizem

no leito da ferida(Bielefeld *et al*, 2012). A fibronectina, proveniente do plasma extravasado, se liga a fibrina, a alguns componentes da matriz extracelular (MEC), tal como o colágeno e às membranas celulares facilitando a fagocitose. Além disso, a fibronectina, bem como os restos celulares e produtos bacterianos atuam como quimioatraentes para variados tipos celulares, dentre eles os monócitos(Rubin *et al*, 2006).

Durante a fase inflamatória, que ocorre de 2 a 3 dias após o surgimento da lesão, os monócitos diferenciam-se em macrófagos e atuam como fagócitos ingerindo debris celulares, neutrófilos mortos, além de secretarem colagenases, fatores de crescimento e citocinas importantes para o recrutamento de fibroblastos, movimento de células epiteliais e angiogênese(Bielefeld *et al*, 2012; Rubin *et al*, 2006; Satish and Kathju 2010). A ação de neutrófilos ou macrófagos, caso seja muito intensa ou prolongada, pode resultar na formação de uma cicatriz indesejada, hipertrófica(Satish and Kathju 2010). Por outro lado, a redução do número de macrófagos presentes na área da ferida durante os estágios iniciais do processo de reparo ocasiona uma redução na extensão da cicatriz formada(Lucas *et al*, 2010).

Outro tipo celular que pode regular a formação ou não de cicatriz durante o processo de reparo é o mastócito. Wulff e colaboradores, em 2012, demonstraram que feridas de embriões de camundongos que se encontram em um estágio do desenvolvimento no qual não há formação de cicatriz apresentam um menor número de mastócitos, quando comparados a feridas de embriões que reparam com a formação de cicatriz, por volta do 18º dia do desenvolvimento. Além disso, a extensão da cicatriz formada em fetos de camundongos Kit^{W^W-v}, deficientes em mastócitos, é significativamente menor quando comparados a fetos do tipo selvagens, Kit^{+/+}(Wulff *et al*, 2012).

Por volta do segundo dia após o surgimento da ferida inicia-se a fase proliferativa que é caracterizada pela re-epitelização da epiderme, reconstituição da derme juntamente com a angiogênese. Os novos brotos de capilares associados com fibroblastos e macrófagos dão origem ao tecido de granulação, que atua como um substrato para a migração dos queratinócitos, os quais proliferam, diferenciam e recompõem a barreira funcional do epitélio(Bielefeld *et al*, 2012; Gurtner *et al*, 2008). Os fibroblastos recrutados para o leito da ferida proliferam e secretam proteínas da MEC(Bielefeld *et al*, 2012). O coágulo de fibrina começa então a ser destruído por ação das metaloproteinases e da fagocitose. À medida que a fibrina vai sendo removida, ocorre à deposição de uma matriz temporária formada por variantes imaturas ou embrionárias da MEC, tais como a fibronectina e colágeno do tipo III,

além de proteoglicanos e colágeno do tipo I (Bielefeld *et al*, 2012; Clark 1990; Ffrench-Constant *et al*, 1989; Rubin *et al*, 2006).

Alguns fibroblastos aumentam os níveis de expressão de moléculas de adesão e diferenciam-se em miofibroblastos, células contráteis com altos níveis de α -actina de músculo liso (α -SMA), que contribuem para a aproximação das bordas da ferida e juntamente com os fibroblastos atuam na síntese e alinhamento das fibras de colágeno (Gurtner *et al*, 2008; Hinz 2007; Satish and Kathju 2010).

Por volta de duas a três semanas após a ferida inicia-se a fase de remodelamento, que pode durar indefinidamente sem que a região ferida alcance a força da pele intacta, não lesionada (Bielefeld *et al*, 2012; Gurtner *et al*, 2008; Pagnano *et al*, 2009). Neste período os processos ativados logo após a lesão começam a cessar. A maioria das células encontradas no leito da ferida sofre apoptose (Desmouliere *et al*, 1995) e esta região passa a se constituir principalmente por colágeno e outras proteínas de matriz. Na verdade, a reorganização desta matriz envolve a degradação e substituição da MEC imatura ou embrionária, rica em fibronectina e colágeno tipo III, por colágeno tipo I, cujas fibras apresentam uma organização em bandas (Bielefeld *et al*, 2012; Gurtner *et al*, 2008). Juntos estes eventos são responsáveis pelo aumento da força de tensão, diminuição do tamanho da cicatriz e redução dos sinais inflamatórios resultando na formação de um tecido cicatricial acelular que é bem diferente da pele não lesada (Bielefeld *et al*, 2012; Gurtner *et al*, 2008; Pagnano *et al*, 2009; Satish and Kathju 2010).

Usualmente em humanos adultos o reparo resulta na formação de uma cicatriz que frequentemente se torna contraída e menos resistente a tensão. Este novo tecido é, em sua maioria, formado por fibroblastos que depositam uma MEC desorganizada e rica em colágeno. Em alguns casos a partir de uma hiperproliferação de fibroblastos há uma deposição excessiva de colágeno que pode resultar na formação de cicatrizes hipertróficas ou quelóides. Embora ambos apresentem-se elevados, a cicatriz hipertrófica se restringe as margens da lesão inicial e frequentemente tende a uma regressão espontânea, enquanto os quelóides apresentam margens que ultrapassam a lesão inicial, ocasionam dor e não regredem de maneira espontânea (Gauglitz *et al*, 2011). Por outro lado, durante o desenvolvimento embrionário/fetal o reparo da pele pode reconstruir completamente a arquitetura do tecido original em um processo chamado regeneração (Bielefeld *et al*, 2012; Gurtner *et al*, 2008).

Uma das hipóteses para explicar como o resultado final do processo de reparo é diferentemente determinado durante a ontogênese envolve o sistema imune, uma vez que

fetos, cujo sistema imune ainda encontra-se imaturo, e camundongos adultos atímicos (*nude-nu*) reparam a pele sem a formação de cicatriz (Bielefeld *et al*, 2012; Gawronska-Kozak *et al*, 2006; Gurtner *et al*, 2008). De fato, o reparo de feridas fetais não apresenta uma fase inflamatória aguda como ocorre em adultos (Armstrong and Ferguson 1995; Cowin *et al*, 1998; Hopkinson-Woolley *et al*, 1994; Rolfe and Grobbelaar 2012) estando as células imunes, tais como macrófagos e mastócitos, reduzidas e menos ativadas (Cowin *et al*, 1998; Hopkinson-Woolley *et al*, 1994; Wulff *et al*, 2012). Da mesma forma o perfil de expressão e a concentração de alguns fatores de crescimento e citocinas são diferentes durante o reparo fetal e adulto (Cowin *et al*, 1998; Rolfe and Grobbelaar 2012). Por exemplo, a pele fetal apresenta menores níveis de TGF- β 1 e maiores níveis de TGF- β 3 durante o reparo, quando comparado com o reparo em adultos (Soo *et al*, 2003).

Assim como mostrado para o processo inflamatório, os componentes da MEC, tais como a tenacina-C e alguns tipos de colágeno, são depositados diferentemente em feridas fetais e de mamíferos adultos. Por exemplo, enquanto a expressão de tenacina-C é detectada, em fetos, nas margens da ferida uma hora após a realização da mesma, em adultos ela só é observada vinte quatro horas após a realização da lesão (Whitby and Ferguson 1991). Em relação às fibras de colágeno, lesões em pele de fetos apresentam uma maior relação entre colágeno III/I quando comparados a feridas realizadas em mamíferos adultos (Namazi *et al*, 2011). Interessantemente, a deposição de colágeno não difere apenas na proporção de colágeno III/I ou em sua distribuição espacial e temporal, mas a organização das fibras também apresenta variações significativas. Em feridas fetais o colágeno depositado apresenta um padrão reticular indistinguível das fibras encontradas no tecido adjacente à lesão, enquanto que em feridas no adulto estas fibras apresentam-se organizadas em bandas alinhadas paralelamente à epiderme (Bielefeld *et al*, 2012; Rolfe and Grobbelaar 2012; van Zuijlen *et al*, 2003).

1.3 – Neuropeptídeos e a pele

Trabalhos recentes mostraram que há um retardo no tempo de fechamento de lesões cutâneas após a desnervação da pele (Martinez-Martinez 2012), o que impede também a regeneração de membros em anfíbios urodelos, tais como as salamandras (Dresden 1973). Interessantemente análises do blastema durante a regeneração dos membros posteriores de

larvas de *Xenopus* mostraram um aumento da expressão da pro-opiomelanocortina (POMC), precursor de alguns peptídeos hormonais, dentre eles o hormônio alfa-melanócito estimulante (α -MSH) (King *et al*, 2003).

A interligação entre inervação e reparo de lesões deve ocorrer através da liberação de neuropeptídeos, um grupo heterogêneo de moléculas polipeptídicas constituídas por aproximadamente 5 a 50 aminoácidos, produzidos a partir de grandes precursores, os quais são clivados e frequentemente modificados após a tradução (Hoyer and Bartfai 2012; Scholzen *et al*, 1998). Na pele, os neuropeptídeos são sintetizados e liberados predominantemente por pequenos neurônios aferentes não mielinizados, as fibras C, e em menor quantidade, pelas pequenas fibras mielinizadas A δ . Além disso, os neuropeptídeos podem ser produzidos por células da pele, tais como queratinócitos, células endoteliais e fibroblastos, bem como células do sistema imune, residentes ou que infiltram na pele sob condições inflamatórias (Scholzen *et al*, 1998).

Diversos trabalhos têm mostrado que certas doenças de pele, tais como psoríase e dermatite atópica, apresentam um componente neurogênico (Auriemma *et al*, 2012; Lotti *et al*, 1995; Luger 2002; Roosterman *et al*, 2006; Scholzen *et al*, 1998). Além disso, os neuropeptídeos têm sido relacionados a processos inflamatórios, angiogênicos e fibroproliferativos em lesões cutâneas (Hiltz and Lipton 1990; Hocking *et al*, 2010; Kokot *et al*, 2009).

1.4 – Hormônio Alfa-Melanócito Estimulante (α -MSH)

Dentre os vários neuropeptídeos o hormônio α -MSH, uma melanocortina natural, tem se destacado por apresentar ampla atividade anti-inflamatória e imunomoduladora (Brod and Hood 2008; Eves *et al*, 2006; Hiltz and Lipton 1990; Jahovic *et al*, 2004; Luger *et al*, 2000; Raap *et al*, 2003). Ele é um tridecapeptídeo originado a partir do processamento pós-traducional da POMC pela ação proteolítica de uma família de convertases prohormônios, dentre elas as enzimas PC1 e PC2/7B2 (Benjannet *et al*, 1991; Bohm *et al*, 2006; Brzoska *et al*, 2008; Seidah *et al*, 1999).

Embora originalmente descrito na glândula pituitária, atualmente sabe-se que o α -MSH é sintetizado por células da pele, tais como queratinócitos, células de Langerhans, melanócitos, células do folículo piloso, células endoteliais da microvasculatura dermal, além

de células do sistema imune, tais como monócitos e linfócitos(Bohm *et al*, 1999; Catania and Lipton 1993; Harvey *et al*, 2012; Lipton and Catania 1997; Luger *et al*, 2000; Luger *et al*, 1997; Muffley *et al*, 2011; Thody *et al*, 1983)

O peptídeo α -MSH se liga a receptores específicos localizados na superfície das células alvo, os receptores de melanocortinas (MC-R), os quais pertencem à superfamília de receptores acoplados a proteína G e possuem sete domínios transmembrana. Existem cinco subtipos de receptores de melanocortinas, MC-1R a MC-5R, os quais são expressos em diferentes células e apresentam afinidades distintas para o α -MSH(Brzoska *et al*, 2008; Luger and Brzoska 2007).

O MC-1R é expresso em células de diferentes tecidos, dentre elas células da pele, tais como melanócitos(Thody *et al*, 1993), queratinócitos(Moustafa *et al*, 2002; Muffley *et al*, 2011), fibroblastos(Bohm *et al*, 1999), basófilos(Bohm *et al*, 2012), células endoteliais e células da unidade pilosebácea. Além disso, o MC-1R é expresso também por macrófagos/monócitos, linfócitos, neutrófilos, mastócitos e células dendríticas(Becher *et al*, 1999; Bohm *et al*, 2006; Brzoska *et al*, 2008; Catania *et al*, 1996; Neumann Andersen *et al*, 2001). Inicialmente acreditou-se que a principal função do MC-1R estava relacionada à regulação da fisiologia da pele e à melanogênese, porém sua expressão em células do sistema imune associada a uma significativa redução da ativação e translocação de NF- κ B sugerem sua ativa participação na inflamação(Maaser *et al*, 2006; Manna and Aggarwal 1998). Dentre as melanocortinas o peptídeo α -MSH é o que apresenta maior afinidade pelo MC-1R(Brzoska *et al*, 2008; Luger 2002; Maaser *et al*, 2006), assim tem sido sugerido que ele exerça seu efeito anti-inflamatório, em partes, através da ligação e ativação de MC-1R.

O MC-2R se liga especificamente ao hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), mas não em outras melanocortinas. Ele é expresso em células da glândula adrenal, onde atua na produção e liberação de esteróides, e também em queratinócitos, linfócitos, adipócitos e células β do pâncreas(Luger 2002; Maaser *et al*, 2006).

Ambos MC-3R e MC-4R são expressos na musculatura esquelética e no sistema nervoso central (SNC), onde regulam o comportamento alimentar. Há também evidências da expressão de MC-3R em macrófagos e linfócitos sugerindo que ele medeia alguns dos efeitos anti-inflamatórios do α -MSH. Além disso, o MC-3R também é expresso no tecido cardíaco, onde participa da regulação das funções cardiovasculares(Getting *et al*, 2003; Maaser *et al*, 2006), enquanto o MC-4R é expresso em linfócitos e células das papilas da derme. O α -MSH

apresenta uma afinidade menor ou igual ao ACTH para o MC-3R, já para o MC-4R estes hormônios apresentam uma afinidade igualmente forte (Brzoska *et al*, 2008).

O MC-5R atua na regulação da secreção das glândulas sebáceas e termoregulação. Camundongos mutantes para o gene *Mc-5r* apresentam uma redução na secreção das glândulas sebácea (Chen *et al*, 1997; Maaser *et al*, 2006). Além disso, MC-5R também é expresso em mastócitos, macrófagos e linfócitos (Brzoska *et al*, 2008; Maaser *et al*, 2006). Nas células B e T a ligação de α -MSH ao receptor MC-5R ativa a via JAK/STAT, o que sugere uma ação imunomodulatória deste receptor (Buggy 1998). O peptídeo α -MSH apresenta uma afinidade maior ou igual ao do ACTH para o MC-5R (Brzoska *et al*, 2008).

A maioria dos efeitos anti-inflamatórios do α -MSH *in vitro* foi encontrada juntamente com a expressão de MC-1R (Luger and Brzoska 2007). Dentre eles tem sido demonstrado que este peptídeo é capaz de suprimir a produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como IFN- γ (Luger *et al*, 1993), TNF- α (Hill *et al*, 2006), IL-1 β (Bohm *et al*, 1999), bem como de outros mediadores inflamatórios, tais como prostaglandina (Nicolaou *et al*, 2004), espécies reativas de oxigênio (Oktar *et al*, 2004) e histamina (Adachi *et al*, 1999), além de induzir a produção de IL-10 (Bhardwaj *et al*, 1997; Redondo *et al*, 1998). Adicionalmente α -MSH é capaz de inibir a ativação de NF- κ B, por meio do aumento dos níveis intracelulares de cAMP, impedir a degradação da subunidade inibitória I κ B α e a translocação da subunidade p65 de NF- κ B para o núcleo em células monocíticas humanas da linhagem U937 (Manna and Aggarwal 1998) e células endoteliais da microvasculatura dermal (Kalden *et al*, 1999).

Ainda *in vitro*, foi demonstrado que α -MSH suprime a proliferação de linfócitos T (Cooper *et al*, 2005) e a ativação de basófilos humanos induzida por alérgeno (Bohm *et al*, 2012), os níveis de expressão das moléculas de adesão E-selectina, VCAM (Kalden *et al*, 1999), ICAM-1 (Morandini *et al*, 1998) e de moléculas coestimulatórias, tal como CD86 (Bhardwaj *et al*, 1997).

Estudos *in vivo* mostraram que o neuropeptídeo α -MSH apresenta uma potente atividade antipirética (Daynes *et al*, 1987; Martin and Lipton 1990). Além disso, o tratamento com este peptídeo é capaz de inibir a inflamação aguda, como demonstrada pela redução do edema de pata induzido pela injeção de carragenina (Hiltz and Lipton 1990), a inflamação alérgica das vias aéreas (Raap *et al*, 2003) e suprimir a síntese de colágeno, reduzindo a fibrose tecidual em modelo murino de esclerodermia (Kokot *et al*, 2009).

Na pele o α -MSH atua na síntese de eumelanina, na regulação da proliferação e diferenciação de queratinócitos e melanócitos, além de modular a produção de citocinas por

células endoteliais e fibroblastos(Scholzen *et al*, 1998). Também foi demonstrado que ele é capaz de induzir células T reguladoras imunossupressoras *in vitro* e *in vivo*, as quais inibiram a progressão da inflamação de pele, semelhante à psoríase, em camundongos, e suprimiram a proliferação e secreção de citocinas por células T-helper-17 (Th17) de pacientes com psoríase (Auriemma *et al*, 2012).

Durante a fase inicial do reparo de lesões de pele, Muffley e colaboradores, em 2011, mostraram a expressão do receptor MC-1R e seu ligante α -MSH, tanto em células inflamatórias, quanto em queratinócitos da língua epitelial, na área da ferida.

1.5 – A proteína agouti

A proteína agouti é uma molécula de sinalização parácrina secretada por células da papila dermal, adjacentes aos melanócitos(Bultman *et al*, 1992; Lu *et al*, 1994; Ollmann *et al*, 1997). É expressa na região do folículo piloso, onde afeta a pigmentação da pele por ser um antagonista de MC-1R(Bultman *et al*, 1992; Lu *et al*, 1994). A ligação de α -MSH ao receptor dispara a elevação dos níveis de cAMP e ativação da tirosinase, enzima limitante da velocidade de melanogênese, resultando na produção de eumelanina. Na presença de agouti, a síntese de eumelanina é desligada e a via padrão de produção da feomelanina é ativada(Dinulescu and Cone 2000).

Em roedores *Agouti* é expresso somente na pele, em humanos, entretanto, *AGOUTI* tem um amplo padrão de distribuição, sendo expresso no tecido adiposo, nos testículos, nos ovários, coração e em níveis mais baixos nos rins e fígado(Kwon *et al*, 1994). Sua exata função biológica permanece desconhecida, uma vez que parece não desempenhar nenhum papel na pigmentação humana(Dinulescu and Cone 2000).

Estudos in vitro usando proteína recombinante de rato mostraram que agouti é um potente antagonista de MC-1R e MC-4R (faixa nanomolar), um antagonista relativamente fraco de MC-3R e um antagonista muito fraco para o MC-5R. Estudos farmacológicos de agouti murino demonstraram que seu mecanismo de ação é um clássico antagonismo competitivo pelos receptores de melanocortina(Kiefer *et al*, 1998; Lu *et al*, 1994; Willard *et al*, 1995).

A análise funcional da proteína de sinalização agouti (ASP) recombinante, o homólogo humano da proteína agouti murina, indica um perfil farmacológico semelhante. Em

humanos ASP é um antagonista potente de MC-1R e MC4-R e um antagonista relativamente fraco em MC-3R e MC5-R. O antagonismo competitivo de ASP é evidente, no entanto, apenas para MC1-R (Yang *et al*, 1997).

2 – JUSTIFICATIVA

Atualmente diversos trabalhos têm mostrado que o sistema imune é fundamental para se determinar a qualidade do processo de reparo, principalmente no que diz respeito à extensão da cicatriz formada e capacidade de recuperação, anatômica e funcional, de órgãos e tecidos lesionados. Durante o processo de reparo de feridas cutâneas a ausência de um processo inflamatório ou a redução do mesmo tem sido correlacionada à maior capacidade regenerativa observada em fetos ou um melhor processo de cicatrização em adultos.

O hormônio α -MSH apresenta intensas propriedades anti-inflamatórias, é produzido na pele e já foi demonstrado sendo capaz de melhorar algumas alterações inflamatórias neste órgão. Logo, investigar se este peptídeo é capaz de alterar a inflamação durante as fases iniciais do reparo de lesões cutâneas, de modo que resulte em uma melhora da cicatriz formada, pode contribuir para ampliar a compreensão a respeito do processo de cicatrização de feridas e sua relação com o sistema imune.

Segundo a Sociedade Internacional de Cirurgia Plástica Estética (ISAPS), o Brasil ocupa o segundo lugar no ranking mundial de cirurgias plásticas (ISAPS 2010), entre os quais, de acordo a Sociedade Brasileira de Cirurgia Plástica (SBCP), cerca de 73% são estéticas e 27% de reparação (SBCP 2009). Assim, aliado à necessidade de ampliar o conhecimento sobre como o sistema imune pode interferir diretamente no processo de reparo e considerando que o número de cirurgias plásticas realizadas no mundo tem aumentado a cada ano a prevenção ou redução da formação de cicatrizes, em alguns casos hipertróficas, após uma cirurgia é uma importante área de interesse da cirurgia plástica.

3 – OBJETIVOS

3.1 – Objetivo Geral

Avaliar se a injeção do α -MSH ou de agouti, minutos antes da realização de uma lesão cutânea, altera a cicatrização em camundongos adultos.

3.2 – Objetivos específicos

A – Investigar se o peptídeo α -MSH ou a proteína agouti alteram o número de leucócitos, fibroblastos e mastócitos na área da cicatrização no terceiro dia após a lesão.

B – Analisar macroscópica e microscopicamente se o peptídeo α -MSH ou a proteína agouti alteram a área de cicatriz aos 40 dias após a lesão.

C – Verificar se o peptídeo α -MSH ou agouti alteram a deposição de colágeno ou o número de fibroblastos presentes na área da lesão 40 dias após sua realização.

D – Analisar e quantificar a deposição de colágeno I e III na área de cicatriz, 40 dias após a realização da ferida cutânea e injeção de α -MSH.

4 – MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 – Animais

Camundongos C57BL/6, machos, de 8-10 semanas, obtidos do Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) foram acomodados no Biotério de Animais Experimentais do Departamento de Morfologia (Câmara Climatizada), alimentados com ração padrão para camundongos e água de acordo com as recomendações do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Pró-Reitoria de Pesquisa da UFMG. Protocolo CETEA/UFMG número 7/2009.

4.2 – Organização e denominação dos grupos experimentais

Durante a realização dos experimentos os animais foram divididos, aleatoriamente, em grupos de 5 indivíduos. Após a realização da lesão excisional na pele do dorso, os camundongos foram acomodados em gaiolas isoladas para que fossem minimizadas as interferências no processo de reparo tecidual.

A partir de dados da literatura a dose de proteína agouti administrada nos animais foi de 125 mg/kg. Para o hormônio α -MSH foi necessário padronizar a dose a ser utilizada uma vez que haviam dados muito diferentes na literatura. Assim foram testadas 3 doses: 0,5 mg/kg, 1,0 mg/kg e 2,5 mg/kg.

A denominação dos grupos durante a realização dos experimentos, bem como os procedimentos aos quais cada um foi submetido são apresentados na tabela 1.

Tabela 1 – Grupos experimentais

Grupos	Salina 0,9%(via <i>i.p</i>)	Tratamento(via <i>ip</i>)
Pele Intacta	-	-
Salina	+	-
α -MSH	-	0,5 mg/kg de α -MSH
α -MSH	-	1,0 mg/kg de α -MSH
α -MSH	-	2,5 mg/kg de α -MSH
Agouti	-	125mg/kg de Agouti

4.3 – Injeção de salina 0,9%

Na mesma data em que os animais dos grupos experimentais foram injetados com o hormônio α -MSH ou com o antagonista agouti, os do grupo salina receberam uma injeção intraperitoneal (*i.p.*) contendo 200 μ L de salina 0,9%.

4.4 – Tratamentos experimentais

Os animais do grupo experimental α -MSH receberam 0,5mg/kg, 1,0mg/kg ou 2,5mg/kg do hormônio, por via *i.p.*, 30 minutos antes da realização da ferida excisional. O peptídeo α -MSH (CALBIOCHEM, USA) foi ressuscitado em água Mili-Q, em uma concentração de 1mg/mL, aliquotado e armazenado a -20°C.

Os animais do grupo experimental agouti receberam 125mg/kg desse antagonista, por via *i.p.*, 30 minutos antes da realização da lesão. Esta proteína (PHOENIX PHARMACEUTICALS, INC, USA) foi ressuscitada em salina, em uma concentração de 100 μ g/mL, aliquotada e armazenada a -20°C.

4.5 – Protocolo experimental

A figura 1 apresenta, de maneira resumida, os principais procedimentos realizados durante a elaboração deste trabalho.

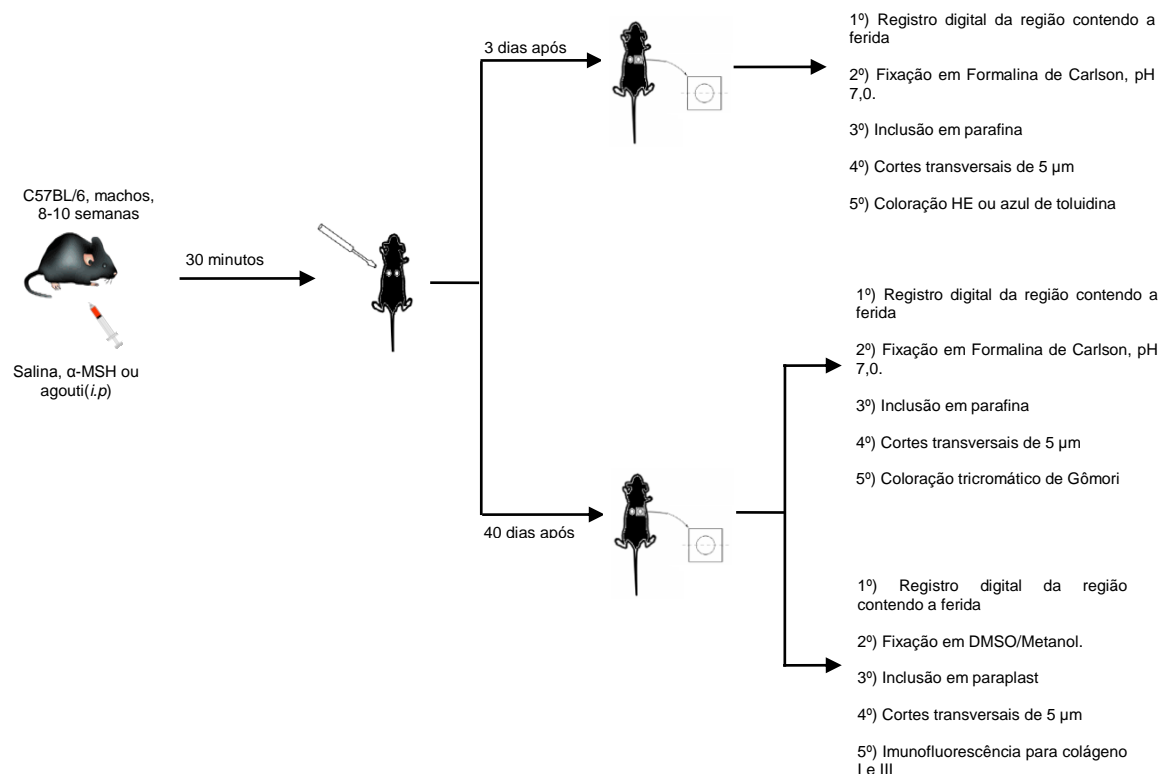


Figura 1 – Protocolo experimental. Os principais procedimentos realizados estão esquematizados nesta figura.

4.6 – Ferida excisional

Os camundongos foram anestesiados pela injeção *i.p.* de 0,10 ml de uma solução de cloridrato de ketamina (97 mg/Kg) (Dopalen injetável-Vetbrands) e Xilazina (16,5 mg/Kg) (Dopaser solução injetável) diluídos 1:3 em salina fisiológica. Após a anestesia, foi feita a tricotomia e limpeza da pele com álcool 70%, e, posteriormente, realizada a ferida na pele do dorso do animal com o auxílio de um punch dermatológico, cujo diâmetro é de 6,5mm, figura 2.

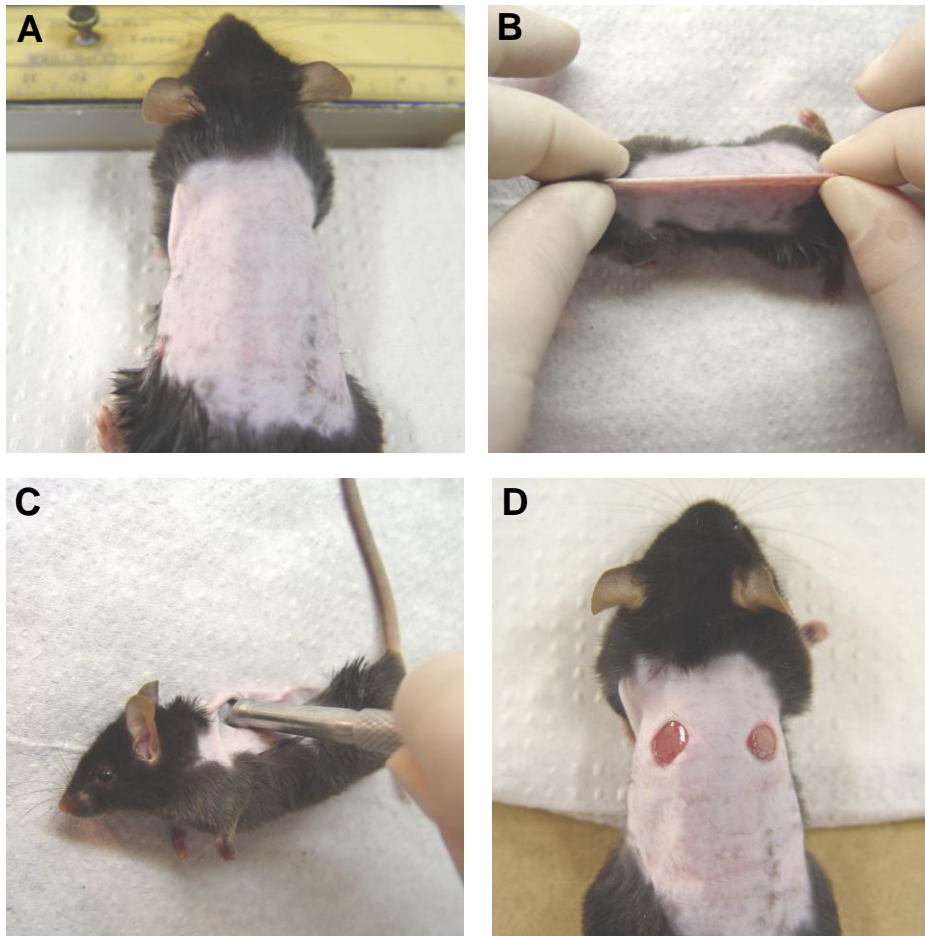


Figura 2 – Esquema de realização da ferida excisional na pele do dorso de camundongos. Em 2A o animal encontra-se em decúbito ventral, anestesiado, com o pêlo da região dorsal raspado (tricotomia). Em seguida a pele da região dorsal é alinhada com o plano mediano do corpo do animal, figura 2B. Posteriormente, em decúbito lateral, com o auxílio de um punch dermatológico cujo diâmetro é de 6,5 mm, figura 2C, 2 lesões excisionais são realizadas na pele do dorso, figura 2D, nas quais são retiradas a epiderme, derme, hipoderme e panículo carnoso.

4.7 – Período pós-operatório

Logo após realização das lesões cutâneas dorsais, enquanto estavam sob o efeito da anestesia, os animais tiveram os olhos cobertos com algodão embebido em salina 0,9% para evitar que os mesmos pudessem sofrer um ressecamento ocular, o que poderia resultar em uma posterior cegueira. Durante todo o período de recuperação pós-operatória gotas de salina 0,9% foram adicionadas ao algodão para que o mesmo pudesse permanecer úmido.

Durante a recuperação após o procedimento cirúrgico os animais foram acondicionados no interior de uma estufa, mantida com a porta semi-aberta, com a temperatura de aproximadamente 36°C, até que apresentassem mobilidade suficiente para serem acondicionados individualmente em suas gaiolas.

4.8 – Período após recuperação cirúrgica

Os animais foram mantidos individualmente por três ou quarenta dias com água e ração *ad libitum* até o momento do sacrifício para coleta da pele com a região lesionada.

4.9 – Coleta da região lesionada e processamento histológico

Três ou quarenta dias após a realização das feridas excisionais, os animais foram anestesiados, a região contendo a lesão foi fotografada e coletada para análise histopatológica. Em todos os experimentos as feridas do lado esquerdo dos animais foram colocadas em papel filtro, fixadas em Formalina de Carson em Tampão Milloning (pH 7.0) por 24h e em seguida transferidas para um recipiente contendo álcool 70%. As feridas do lado direito dos animais foram colocadas em papel filtro, fixadas em DMSO 20% + Metanol 80% a -80°C e criosubstituídas por seis dias.

Após a fixação cada ferida, seja esquerda ou direita, coletada 3 dias após sua realização, foi cortada ao meio, perpendicularmente ao plano ântero-posterior, como mostra a figura 3.

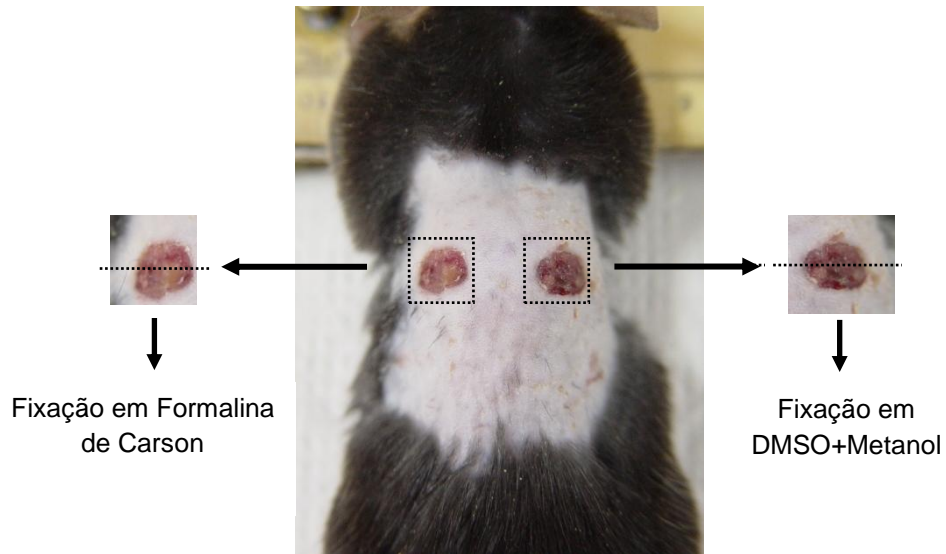


Figura 3 - Coleta da área contendo a ferida cutânea 3 dias após sua realização

As feridas coletadas 40 dias após sua realização também foram cortadas ao meio após fixação, porém paralelo ao plano lateral, como mostra a figura 3.



Figura 4 - Coleta da área contendo a ferida cutânea 40 dias após sua realização.

Posteriormente uma das metades fixadas em Formalina de Carson foi submetida aos seguintes procedimentos:

1º Desidratação: imersão em uma série gradual de alcoóis (80% - 100%), a temperatura ambiente, por 30 minutos cada.

2º Diafanização: imersão em uma seqüência de três recipientes contendo xilol em temperatura ambiente, por 20 minutos cada.

3º Infiltração: imersão em uma seqüência de três recipientes contendo parafina a uma temperatura de 56° C, por 20 minutos cada.

4º Inclusão: em parafina a uma temperatura de 56°C.

Após a inclusão, foram realizados cortes histológicos com uso do Micrótomo Semi Automático (Microm – HM 335 E) na espessura de 5µm. Esses cortes foram corados com hematoxilina e eosina (HE), tricromático de Gômori ou azul de toluidina para avaliação histopatológica.

Para realização da técnica de imunofluorescências tecidos coletados quarenta dias após a lesão, após imersão em DMSO 20% + metanol 80%, por seis dias e acondicionados a -80°C para criosubstituição, foram transferidos para uma temperatura de -20°C onde permaneceram por 24h. Posteriormente foram submetidos às seguintes etapas:

1ª Desidratação: imersão em uma seqüência de três recipientes contendo álcool absoluto, a temperatura ambiente, por 30 minutos cada.

2ª Diafanização: imersão em uma seqüência de dois recipientes contendo xilol a temperatura ambiente, por 30 minutos cada.

3ª Infiltração: imersão em recipientes contendo 50% de Xilol+50% de Paraplast Plus, a uma temperatura de 63°C, por 12 horas. Posteriormente os tecidos foram imersos em uma seqüência de dois recipientes contendo somente paraplast, a uma temperatura de 63°C, por trinta minutos cada.

4ª Inclusão: em Paraplast a uma temperatura de 63°C

Posteriormente à inclusão, foram realizados cortes histológicos com uso do Micrótomo Semi Automático (Microm – HM 335 E) na espessura de 5µm. Na seqüência os tecidos foram submetidos à técnica de imunofluorescência para análise das fibras de colágeno I e III.

4.10 – Técnica de imunofluorescência indireta

Depois de seccionados, os tecidos foram submetidos às seguintes etapas:

- 1^a) **Desparafinização:** imersão em uma sequência de três recipientes contendo xilol a temperatura ambiente, por 5 minutos.
- 2^a) **Hidratação:** imersão em uma série gradual de álcoois (25%-100%). Posteriormente em água a temperatura ambiente por 3 minutos e em seguida em PBS a temperatura ambiente por 3 minutos.
- 3^a) **Bloqueio:** primeiramente a região ao redor dos cortes foram secas, os mesmos circundados com uma caneta hidrofóbica e, posteriormente, 50 µL de uma solução de bloqueio constituída de PBS/BSA 1% + Tween 20 0,1%, a temperatura ambiente, foi adicionada e permaneceu sobre os mesmos por 60 minutos.
- 4^a) **Incubação – anticorpo primário:** a região ao redor dos cortes foi seca, os mesmos circundados com uma caneta hidrofóbica e, posteriormente, 50 µL de uma solução contendo o anticorpo primário diluído em PBS com BSA 0,1% e Tween 20 0,01% foi adicionada e os mesmos acondicionados a 4°C overnight.
- 5^a) **Lavagem:** as lâminas foram imersas três vezes em PBS, a temperatura ambiente, por 5 minutos cada.
- 6^a) **Incubação – anticorpo secundário:** a região ao redor dos cortes foi seca, os mesmos circundados com uma caneta hidrofóbica e, posteriormente, 50 µL de uma solução contendo o anticorpo secundário diluído em PBS com BSA 0,1% e Tween 20 0,01% foi adicionada e permaneceu sobre os mesmos por 60 minutos.
- 7^a) **Lavagem:** as lâminas foram imersas três vezes em PBS, a temperatura ambiente, por 5 minutos cada.
- 8^a) **Montagem das lâminas:** as lâminas foram montadas utilizando uma solução de glicerina 90%/TRIS 1M 10%, pH 9,0, a 25°C.

As especificações dos anticorpos utilizados encontram-se na tabela 2.

Tabela 2 – Especificações dos anticorpos utilizados na técnica de imunofluorescência indireta

Anticorpos	Especificação	Diluição	Fabricante
Primário	Policlonal, coelho anticolágeno I	1:50	Rockland
	Policlonal, coelho anticolágeno III	1:50	Rockland
Secundário	Policlonal, cabra anti-IgG de coelho conjugado com Alexa 488	1:200	Molecular Probes

A denominação dos grupos e os tipos de anticorpos adicionados a cada um são mostradas na tabela 3.

Tabela 3 – Grupos e anticorpos utilizados

Grupos	Anticorpo primário	Anticorpo secundário
Pele intacta	-	-
Pele intacta	-	+
Pele intacta	+	+
Salina	+	+
α -MSH	+	+

O grupo controle pele intacta, no qual não foi utilizado nenhum anticorpo, primário ou secundário, permitiu verificar se o tecido, por si só, possuía autofluorescência. O grupo controle pele intacta no qual foi utilizado somente o anticorpo secundário, permitiu verificar se o mesmo era capaz de se ligar a outra molécula, que não o anticorpo primário.

4.11 – Análise histopatológica qualitativa e quantitativa da área da lesão

Através da coloração de HE foi possível realizar uma descrição qualitativa das regiões lesadas, bem como quantificar o infiltrado de leucócitos e fibroblastos presentes nas mesmas. A coloração de azul de toluidina permitiu a quantificação de mastócitos presentes na área estudada. O tricromático de Gômori possibilitou uma análise qualitativa da disposição das fibras colágenas depositadas na área lesionada, bem como quantificar a área da lesão.

Os cortes submetidos à técnica de imunofluorescência foram analisados em microscópio confocal Zeiss 510 Meta. A partir da técnica de imunofluorescência indireta foi possível analisar, por microscopia confocal, a disposição das fibras de colágeno I e III, depositadas na área da lesão, bem como quantificar a presença de cada uma delas. Para estas análises foram determinadas as diluições ideais dos anticorpos primários e secundário, que são apresentadas na tabela 2.

4.12 – Aquisição de imagens

As imagens dos cortes submetidos às colorações de HE, azul de toluidina ou tricromático de Gômori foram adquiridas utilizando uma câmera Olympus Q Colour 3 acoplada ao microscópio Olympus BX50 conectadas ao computador através do programa Q-Capture Pro (QImaging, Canadá).

As imagens dos cortes submetidos à técnica de imunofluorescência foram adquiridos com a utilização do microscópio confocal Zeiss 510 Meta.

4.13 – Medida da área, em vista macroscópica, da ferida excisional

No terceiro e quadragésimo dia após a realização das feridas as mesmas foram fotografadas antes da coleta. Para isso os animais foram anestesiados e posicionados ao lado de uma régua milimetrada. As fotos foram feitas com máquina digital Sony DSC-F717, mantida todo tempo a uma distância constante da região fotografada, sendo as imagens posteriormente analisadas com o programa Image Tool Version 3.0 (UTHSCSA, San Antonio, Texas USA), através do qual a área da lesão foi determinada em mm².

4.14 – Análise morfométrica em microscopia de luz

O número de leucócitos, mastócitos e fibroblastos foram determinados na área lesada 3 dias após realização da ferida, sendo que estas últimas células também foram contadas após 40 dias. Para isso foi utilizada a objetiva de 100x e contadas dez áreas de $100 \mu\text{m}^2$ cada dentro da região lesionada, com auxílio de um retículo acoplado a ocular do microscópio, figura 5. As áreas analisadas foram determinadas seguindo uma linha reta, sempre deslocando o campo em um único sentido, com espaçamento de 100 a $300 \mu\text{m}$ entre duas regiões analisadas a depender da característica da região de reparo, mantendo cinco áreas logo abaixo do língua epitelial e cinco em uma região mais inferior.

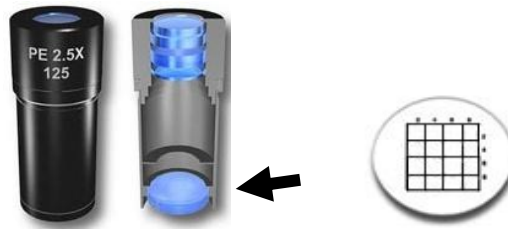


Figura 5 – Retículo utilizado para análises morfométricas. O retículo apresenta uma área de $100 \mu\text{m}^2$ e é acoplado à ocular do microscópio.

4.15 – Análise em microscópio confocal

Os cortes submetidos à técnica de imunofluorescência foram analisados em microscópio confocal (Zeiss 510META; Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany). Foram capturadas de 3 a 5 imagens em diferentes áreas da região de cicatriz. A escolha das áreas foi feita seguindo uma linha reta, sempre deslocando o campo em um único sentido. A intensidade de fluorescência foi analisada com auxílio do programa Image Tool Version 3.0 (UTHSCSA, San Antonio, Texas USA) e do programa Zeiss LSM Image Examiner.

A intensidade de fluorescência é fornecida através da unidade “Nível de Cinza”, que varia do valor zero (preto) ao valor 255 (branco). Quanto mais próximo ao valor 255, maior a intensidade fluorescência. Para a análise quantitativa todos os parâmetros de configuração do microscópio obtidos no início da aquisição dos dados foram mantidos para cada anticorpo

usado para as amostras de todos os grupos experimentais e controle do anticorpo secundário, tornando o nível de fluorescência uniforme, confiável e possível de comparação.

4.16 – Análise estatística dos resultados

As análises estatísticas foram realizadas usando o programa Graphpad Prism5 (GraphPad Software, CA, USA). Uma vez que os dados apresentaram uma distribuição normal (paramétricos) a significância das diferenças entre os grupos foi determinada através de análise de variância utilizando os testes One-way ANOVA, para análises de três grupos ou Teste T de Student não pareado para análise de dois grupos. Foi aplicado o pós-teste Newman-Keuls. Os valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significativos e os resultados foram expressos como a média \pm SEM.

5 – RESULTADOS

5.1 – Padronização da dose do hormônio α -MSH

Partindo de dados existentes na literatura testamos três diferentes doses de α -MSH, 0,5 mg/kg, 1,0 mg/kg e 2,5 mg/kg, para verificar se alguma delas teria efeito no número de leucócitos encontrados no terceiro dia após realização da ferida. O hormônio foi injetado 30 minutos antes da realização da lesão em um volume final de 200 μ l de solução e os animais do grupo controle foram injetados com 200 μ L de salina. Após 3 dias, as feridas foram coletadas, processadas e coradas com HE, como descrito em materiais e métodos, para análises histopatológicas e análise morfométrica do número de leucócitos presentes na área lesionada.

Os animais dos grupos injetados com 0,5 mg/kg e 2,5 mg/kg, de maneira semelhante aos animais do grupo controle salina, apresentaram alterações inflamatórias bem intensas. Nestes grupos foi possível observar a presença de vasos bem dilatados e congestionados, a presença expressiva de material necrofibrinóide (crosta) sobre a área lesada, além de uma grande quantidade de exsudação plasmática e celular, tabela 4. No grupo injetado com 1,0 mg/kg estes sinais inflamatórios descritos anteriormente foram menos intensos.

Tabela 4 – Padronização da dose de α -MSH – análise semiquantitativa

Grupos	Alterações vasculares	Crosta	Exsudato plasmático	Exsudato leucocitário
Salina	+++	+++	+++	+++
0,5 mg/kg de α -MSH	+++	+++	+++	+++
1,0 mg/kg de α -MSH	++	++	+	+
2,5 mg/kg de α -MSH	+++	+++	+++	+++

Considerando que a exsudação de leucócitos é o elemento morfológico mais característico das inflamações (Rubin *et al*, 2006), após análise qualitativa das feridas, foi realizada uma análise quantitativa do número de leucócitos presentes na área da lesão. O número de células inflamatórias presente no grupo injetado com 1,0 mg/kg foi

significativamente menor do que observado no grupo controle salina, bem como nos grupos injetados com 0,5 mg/kg e 2,5 mg/kg de α -MSH, figura 6.

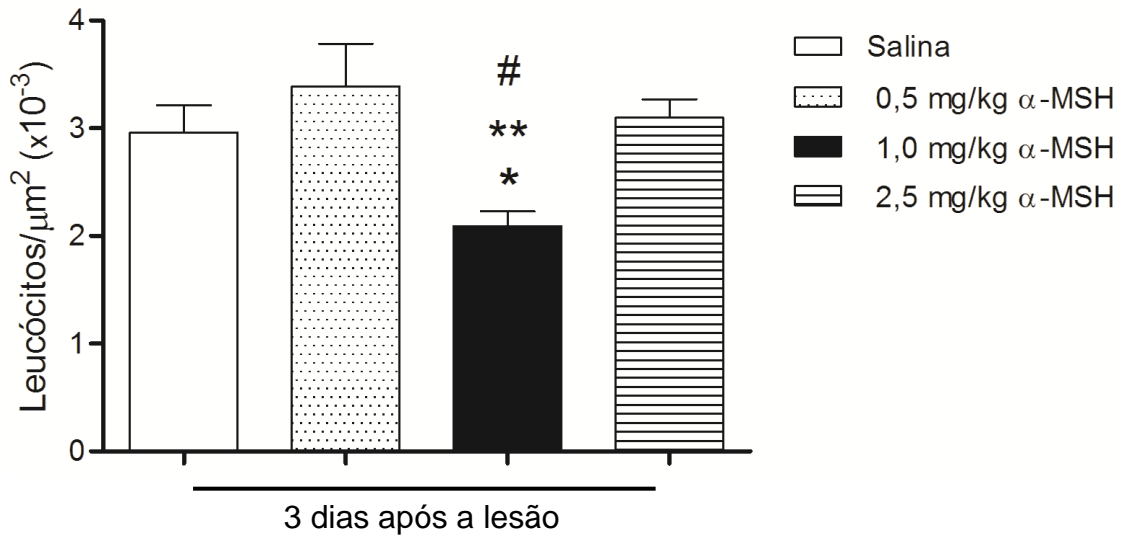


Figura 6 – Injeção de 1,0 mg/kg de α -MSH diminui o número de leucócitos presentes na área da lesão 3 dias após sua realização, enquanto 0,5 mg/kg e 2,5 mg/kg não.. Análise morfométrica do número de leucócitos 3 dias após a lesão + injeção de salina (barra branca), lesão + injeção de 0,5 mg/kg de α -MSH (barra pontilhada), lesão + injeção de 1,0 mg/kg de α -MSH (barra preta) ou lesão + injeção de 2,5 mg/kg de α -MSH (barra com linhas horizontais). Dados representam média \pm erro padrão, * $p \leq 0,05$ 1,0 mg/kg de α -MSH é estatisticamente menor que salina, ** $p \leq 0,05$ 1,0 mg/kg de α -MSH é estatisticamente menor que 0,5 mg/kg de α -MSH, # $p \leq 0,05$ 1,0 mg/kg de α -MSH é estatisticamente menor que 2,5 mg/kg de α -MSH.

5.2 – Determinação da área macroscópica da lesão

No terceiro dias após realização das feridas e injeção de 1,0 mg/kg de do hormônio α -MSH, 125 mg/kg da proteína agouti ou salina, os animais foram anestesiados e posicionados em decúbito lateral, direito e esquerdo, para que a região contendo as lesões fosse fotografada. Para isso foi utilizada uma câmera digital mantida a uma distância constante dos animais, como descrito em materiais e métodos. A escolha de medir a área da ferida e não do diâmetro se deve ao fato de que as lesões de pele apresentam um formato relativamente irregular.

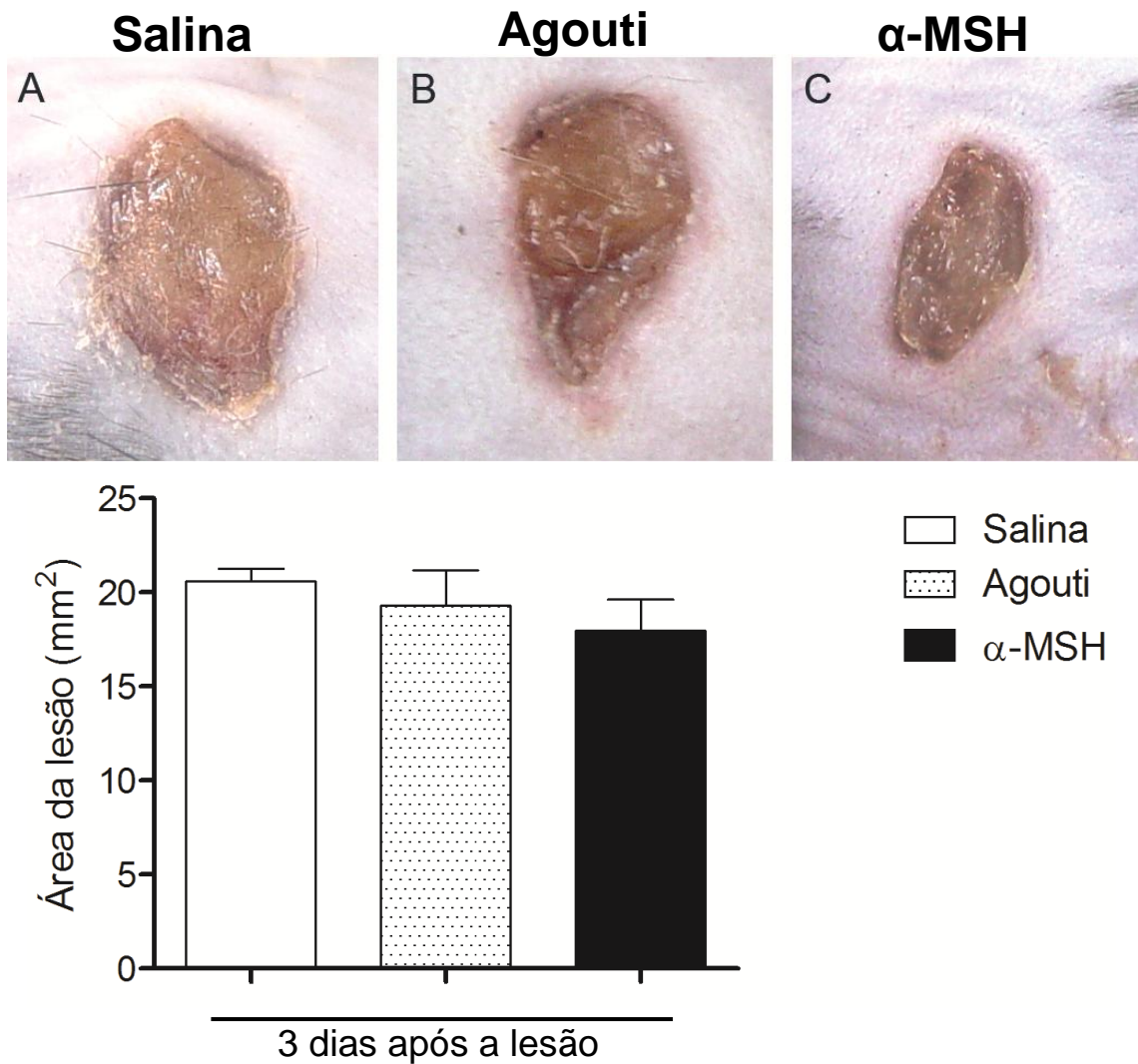


Figura 7 – Injeção de 125 mg/kg de agouti ou 1,0 mg/kg de α -MSH não altera a área das lesões 3 dias após a realização das mesmas. Vista macroscópica da pele da região dorsal dos camundongos contendo a ferida (A-C). Em (D) encontra-se a área da ferida 3 dias após injeção de salina (barra branca), injeção de 125 mg/kg de agouti (barra pontilhada) ou injeção de 1,0 mg/kg α -MSH (barra preta). Dados representam média \pm erro padrão. As médias não foram significativamente diferentes entre os grupos.

Como mostrado na figura 7, a área de lesão medida 3 dias após sua realização, não foi significativamente diferente entre os grupos.

5.3 – Determinação do número de leucócitos e fibroblastos presentes na área da lesão 3 dias após a injeção de α -MSH ou proteína agouti.

A análise histopatológica qualitativa da pele coletada no terceiro dia após a lesão e corada com HE mostrou que o grupo injetado com o neuropeptídeo α -MSH, figura 8C e 8F, apresentou uma menor deposição de material necrofibróide sobre a lesão, alterações vasculares menos acentuadas, como por exemplo, uma redução na frequência de capilares intumescidos e vasos congestos, presença de uma menor área adjacente à lesão rica em células inflamatórias, bem como um menor exsudado plasmático e leucocitário constituído por neutrófilos, macrófagos e linfócitos, figura 8F.

Para realização da análise morfométrica e determinação do número de leucócitos e fibroblastos foram contados dez áreas de 100 μm^2 cada, em um corte histológico, com auxílio de um retículo, como descrito em materiais e métodos.

A análise morfométrica, 3 dias após a lesão, confirmou a análise histopatológica, demonstrando que o grupo injetado com o peptídeo α -MSH apresenta uma redução significativa do infiltrado leucocitário, figura 8G, comparado com os grupos agouti e controle salina. Porém, no que se refere ao número de fibroblastos, não foi observada diferença significativa entre os grupos, figura 8H.

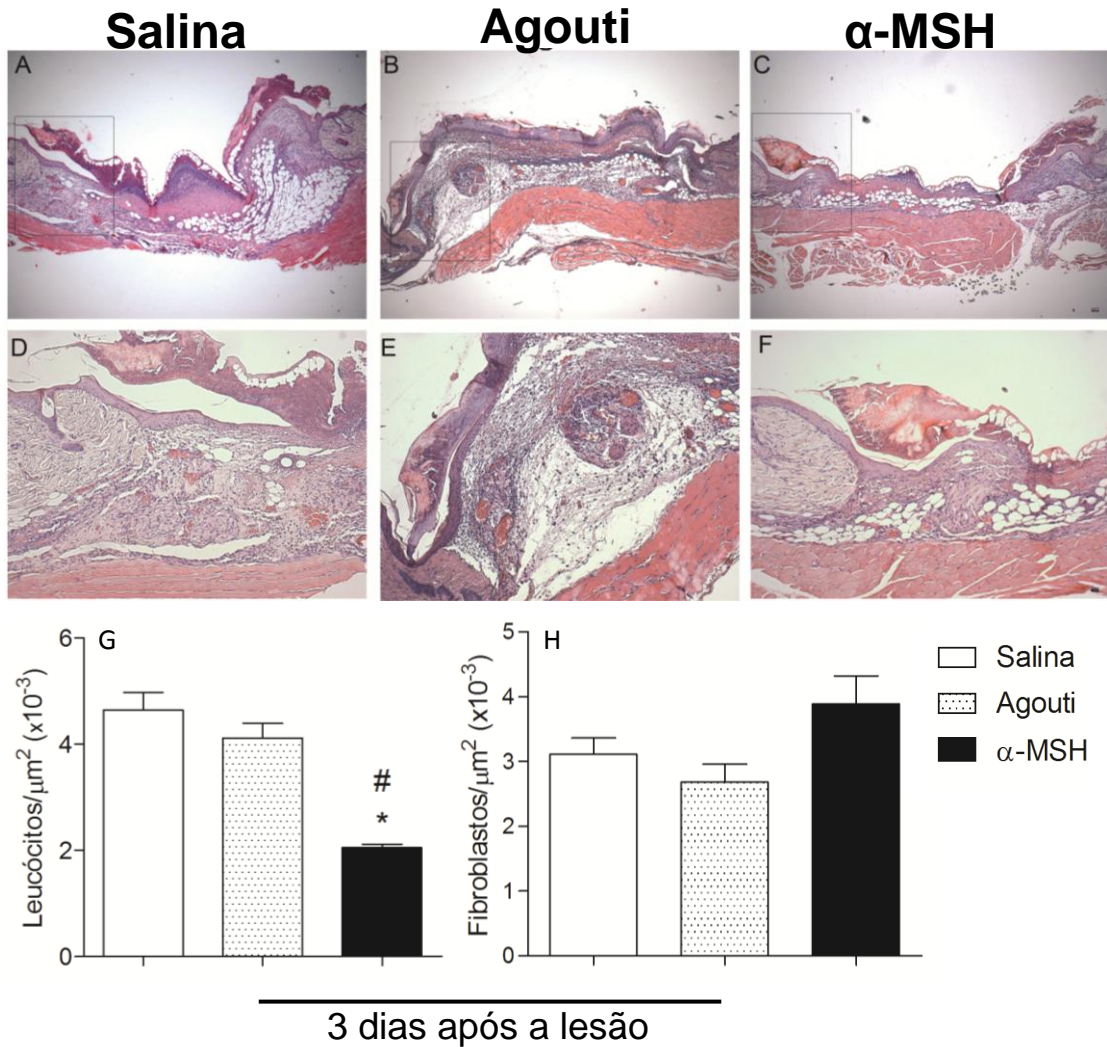


Figura 8 - Injeção de 1,0 mg/kg de α -MSH diminui o número de leucócitos na área da lesão 3 dias após sua realização, mas não o de fibroblastos . Aspecto histológico da área da ferida 3 dias após sua realização nos grupos lesão + salina (A e D), lesão + agouti (B e E) e lesão + α -MSH (C e F). Análise morfométrica do número de leucócitos (G) e fibroblastos (H) presentes na área da lesão 3 dias após a realização da mesma nos grupos lesão + salina (barra branca), lesão + agouti (barra pontilhada) e lesão + α -MSH (barra preta). Dados representam média \pm erro padrão, * $p \leq 0,05$ α -MSH é significativamente menor que o grupo salina, # $p \leq 0,05$ α -MSH é significativamente menor que o grupo agouti. Coloração HE. Magnificação original das microfotografias (A-B-C) 40x e (D-E-F) 100x; escala da barra (A-B-C) = 10 μm e (D-E-F) = 10 μm .

Apesar de não haver uma diferença significativa no número de leucócitos presente entre os grupos salina e agouti, figura 8G, o segundo apresenta algumas alterações inflamatórias mais intensas quando comparado ao primeiro. No grupo tratado com agouti é possível observar uma maior deposição de material necrofibróide sobre as lesões, uma maior presença de exudato plasmático, resultando em uma região mais edemaciada, nervos hipertrofiados, frequentemente circundados por células inflamatórias, além de alterações vasculares mais expressivas, como maior frequência de capilares intumescidos e vasos congestos, figuras 8B e 8E.

5.4 – Determinação do número de mastócitos presentes na área da lesão 3 dias após a injeção de α -MSH ou da proteína agouti.

Posteriormente à quantificação do número de leucócitos presentes na área da lesão, a quantificação do número de mastócitos também foi realizada nos grupos injetados com α -MSH, agouti ou salina. Para isto, a pele coletada no terceiro dia após a lesão foi fixada, submetida a processamento histológico e corada com azul de toluidina. Para realização da análise morfométrica foram contadas dez áreas de 100 μm^2 cada, em um corte histológico, com auxílio de um retículo, como descrito em materiais e métodos.

Assim como observado na análise morfométrica do número de leucócitos, o grupo α -MSH apresentou uma redução significativa do número de mastócitos 3 dias após a lesão, figuras 9C e 9D.

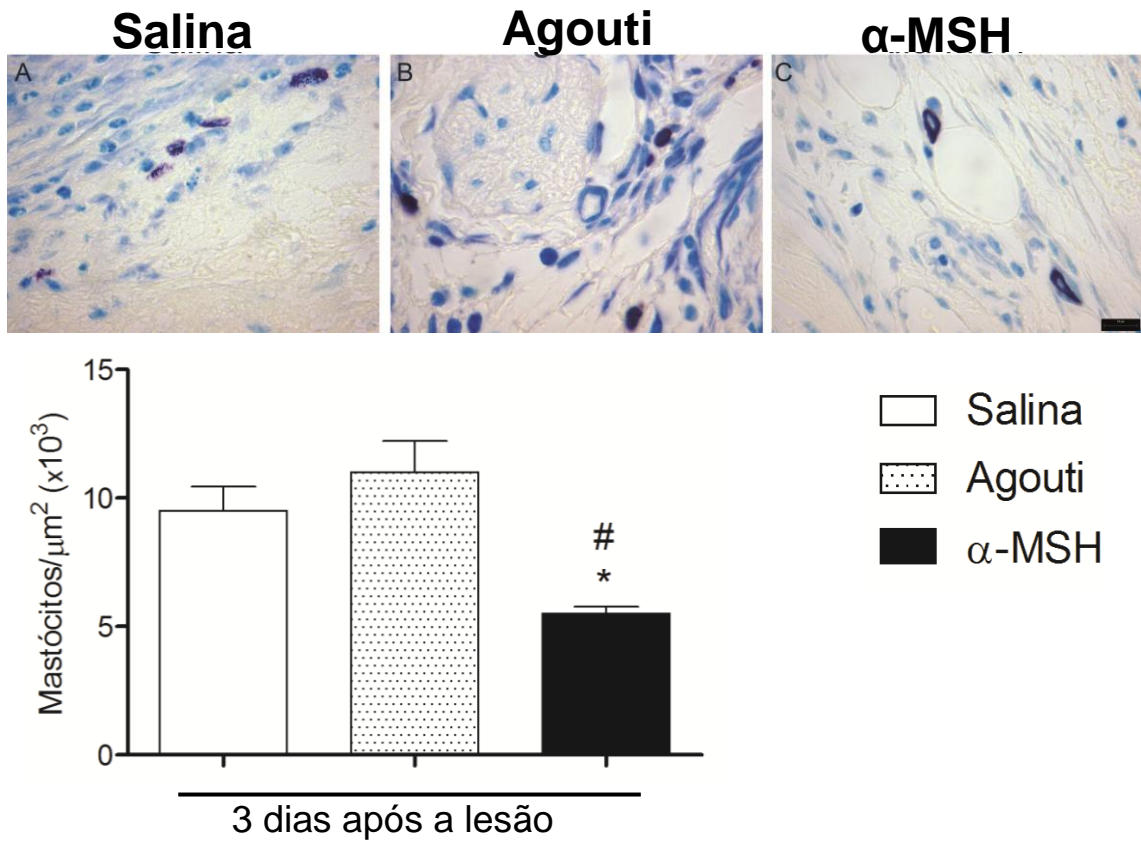


Figura 9 - Injeção de 1,0 mg/kg de α -MSH diminui o número de mastócitos na área da lesão 3 dias após sua realização. Aspecto histológico da área da ferida 3 dias após sua realização nos grupos lesão + salina (A), lesão + agouti (B) e lesão + α -MSH (C). Análise morfométrica do número de mastócitos 3 dias após a lesão nos grupos lesão + salina (barra branca), lesão + agouti (barra pontilhada) e lesão + α -MSH (barra preta). Dados representam média \pm erro padrão, * $p \leq 0,05$ α -MSH é significativamente menor que salina, # $p \leq 0,05$ α -MSH é significativamente menor que agouti. Coloração azul de toluidina. Magnificação original das microfotografias (A-B-C) 1000x; escala da barra (A-B-C) = 10 μm .

5.5 – Determinação macroscópica da área de cicatriz 40 dias após a lesão

Diante dos resultados encontrados a partir das análises histopatológicas, os quais mostram que 1,0 mg/kg do hormônio α -MSH foi capaz de reduzir as alterações inflamatórias ocorridas durante o processo de reparo e sabendo que uma das explicações para a capacidade regenerativa encontrada em fetos relaciona-se, exatamente, com uma redução na intensidade do processo inflamatório (Cowin *et al*, 1998; Rolfe and Grobbelaar 2012) a avaliação de uma fase mais avançada do processo de reparo fez-se necessária.

Para isso, α -MSH, agouti ou salina foram injetados 30 minutos antes da realização da ferida. Depois de 40 dias, os animais foram anestesiados e as regiões contendo as cicatrizes foram fotografadas ao lado de uma régua milimetrada com a utilização de uma câmera digital mantida a uma distância constante das feridas, como descrito em materiais e métodos.

A área de cicatriz do grupo injetado com o peptídeo α -MSH, medida macroscópica, figuras 10C e 10D, foi significativamente menor quando comparada às áreas de cicatrizes formadas nos grupos injetados com salina, figuras 10A, 10D ou com a proteína agouti, figura 10B, 10D.

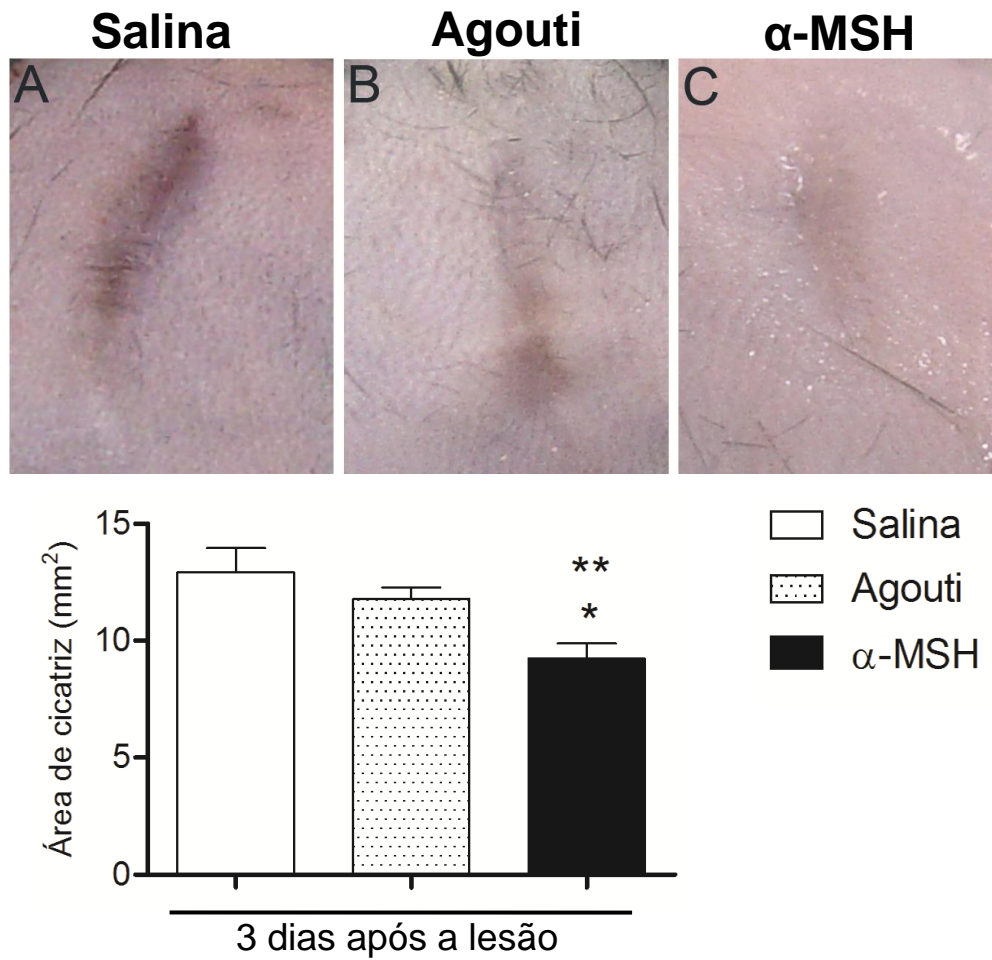


Figura 10 - Injeção de 1,0 mg/kg de α -MSH reduz a área de cicatriz, visão macroscópica, 40 dias após realização da ferida. Visão macroscópica da pele de camundongos mostrando a área de cicatriz 40 dias após a lesão + injeção de salina (A), lesão + agouti (B) e lesão + α -MSH (C). Medida macroscópica da área da cicatriz 40 dias após a lesão + salina (barra branca), lesão + agouti (barra pontilhada) e lesão + α -MSH (barra preta). Dados representam média \pm erro padrão, * $p \leq 0,05$ α -MSH é significativamente menor que o grupo salina, ** $p \leq 0,05$ α -MSH é significativamente menor que o grupo agouti.

5.6 – Avaliação histopatológica e determinação microscópica da área cicatriz 40 dias após a realização da lesão e injeção de α -MSH ou proteína agouti.

Como a injeção de 1,0 mg/kg de α -MSH reduziu a extensão da área de cicatriz observada macroscopicamente 40 dias após a realização das lesões cutâneas avaliamos também a matriz extracelular da região de reparo, se houve a formação de algum anexo da pele ou panículo carnosos, bem como se a redução da área de cicatriz encontrada medida macroscopicamente poderia ser observada microscopicamente. Para isto a pele foi fixada em Formalina de Carson e corada com HE ou tricromático de Gômori, como descrito em materiais e métodos.

Aos 40 dias após a lesão todos os grupos apresentaram o fechamento completo da epiderme, figura 11, como também pode ser visto nas fotografias da pele da região dorsal dos camundongos, figura 10. Embora em todos os grupos uma nova epiderme já havia se formado 40 dias após a lesão, em nenhum dos grupos analisados foi possível observar a formação de novas estruturas, tais como folículos pilosos, glândulas sebáceas ou panículo carnosos, figura 11.

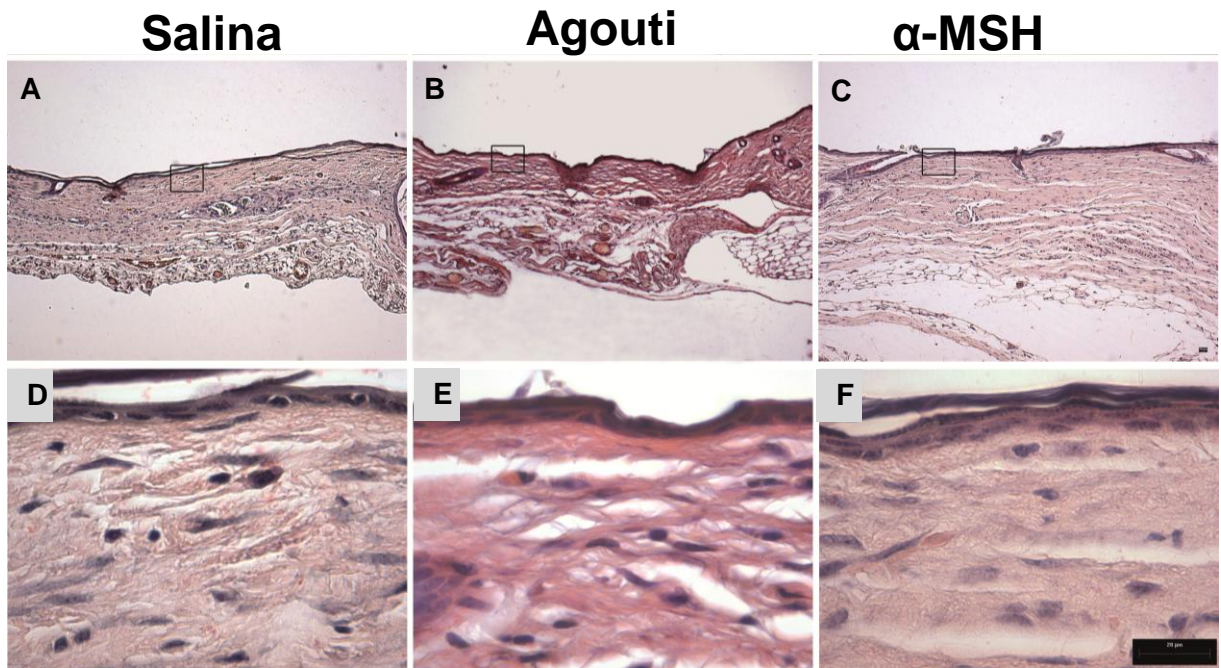


Figura 11 – Re-epitelização 40 dias após a injeção de salina, 1,0 mg/kg de α -MSH ou 125 mg/kg de agouti. . Aspecto histológico da área de cicatriz 40 dias após realização da lesão + salina (A, D), lesão + agouti (B, E), lesão + α -MSH (C, F). Coloração de Hematoxilina e eosina. Magnificação original das microfotografias de (A-B-C) 100x, (D-E-F) 1000x; escala da barra (A-B-C) = 10 μ m, (D-E-F) = 20 μ m.

Por outro lado, uma diferença bem acentuada na deposição das fibras de colágeno pode ser observada, figuras 12 e 13. A pele intacta, apresenta fibras de colágeno mais espessas, constituídas de bandas menores e dispostas em um arranjo mais reticular, entrelaçado, figura 13D. Já o grupo salina apresenta uma maior retração na região da ferida com deposição de fibras mais alongadas e delgadas, dispostas paralelamente à epiderme e extremamente compactadas, figuras 12A e 13A.

O grupo agouti apresenta uma retração da pele na área de reparo menos acentuada quando comparado ao grupo salina, figuras 12A e 12D, respectivamente. No grupo agouti, figura 13B, as fibras da região de reparo também são mais alongadas e delgadas quando comparadas com as da pele intacta, além de apresentarem uma organização paralela à epiderme, porém elas são mais definidas e estão dispostas de uma maneira muito frouxa quando comparadas às do grupo salina, figura 13A.

O grupo α -MSH, figura 13C, é o que apresenta uma disposição morfológica das fibras mais semelhante à pele intacta. É possível observar que diferentemente do grupo salina, neste grupo as fibras são menores, menos compactas, mais espessas e dispostas de maneira mais irregular, não paralelas à epiderme.

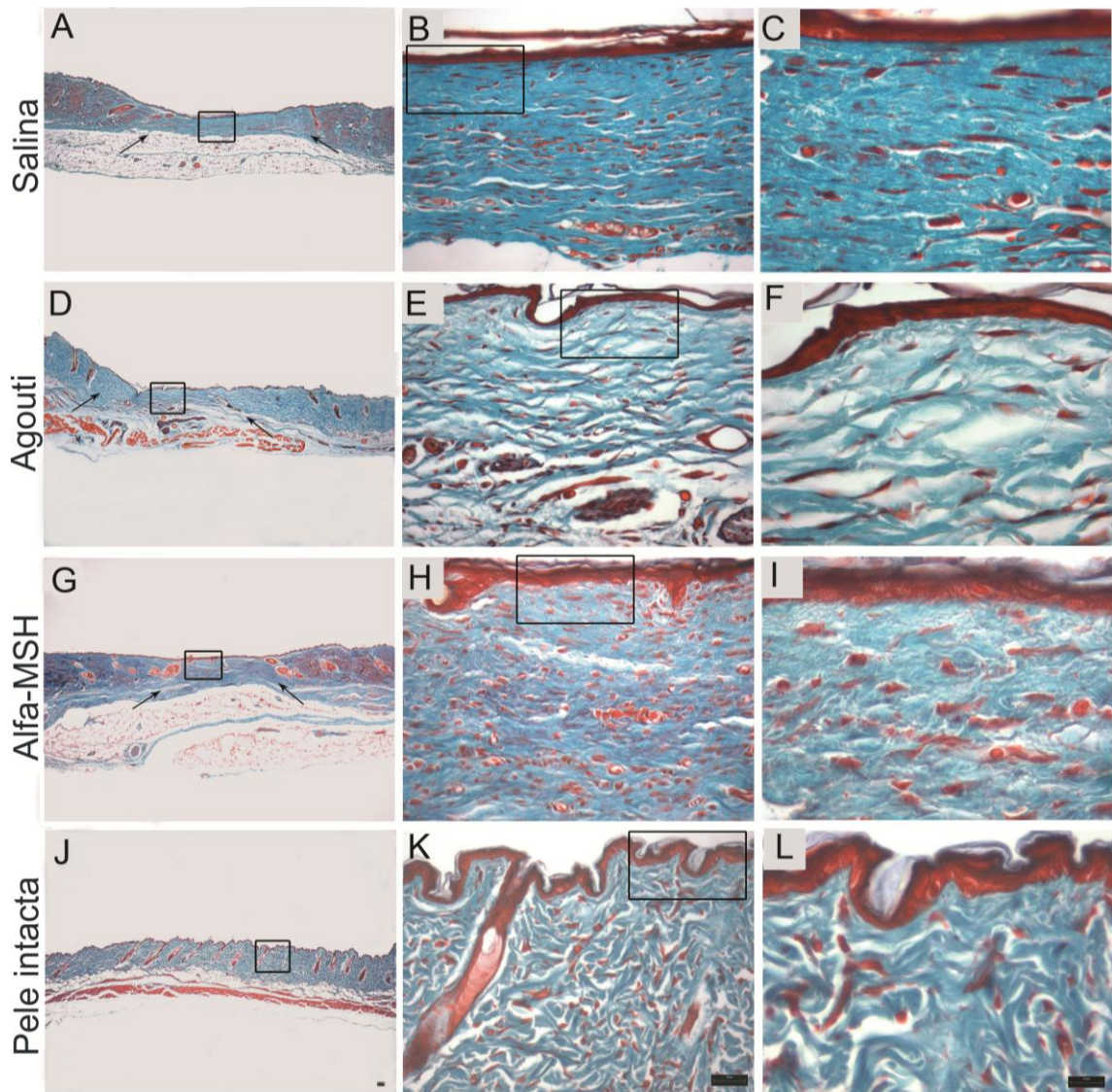


Figura 12 – Área de cicatriz, visão microscópica, e organização das fibras colágenas 40 dias após a lesão . Visão microscópica da pele de camundongos mostrando a área de cicatriz 40 dias após a lesão + injeção de salina (A), lesão + agouti (D) e lesão + α -MSH (G). Aspecto histológico das fibras colágenas na área de cicatriz 40 dias após realização da lesão + salina (A, B, C), lesão + agouti (D, E, F), lesão + α -MSH (G, H, I), pele intacta (J, K, L). Coloração tricromático de Gômori. Magnificação original das microfotografias de (A-D-G-J) 40x, (B-E-H-K) 400x, (C-F-I-L) 1000x; escala da barra (A-D-G-J) = 20 μ m, (B-E-H-K) = 10 μ m, (C-F-I-L) = 10 μ m

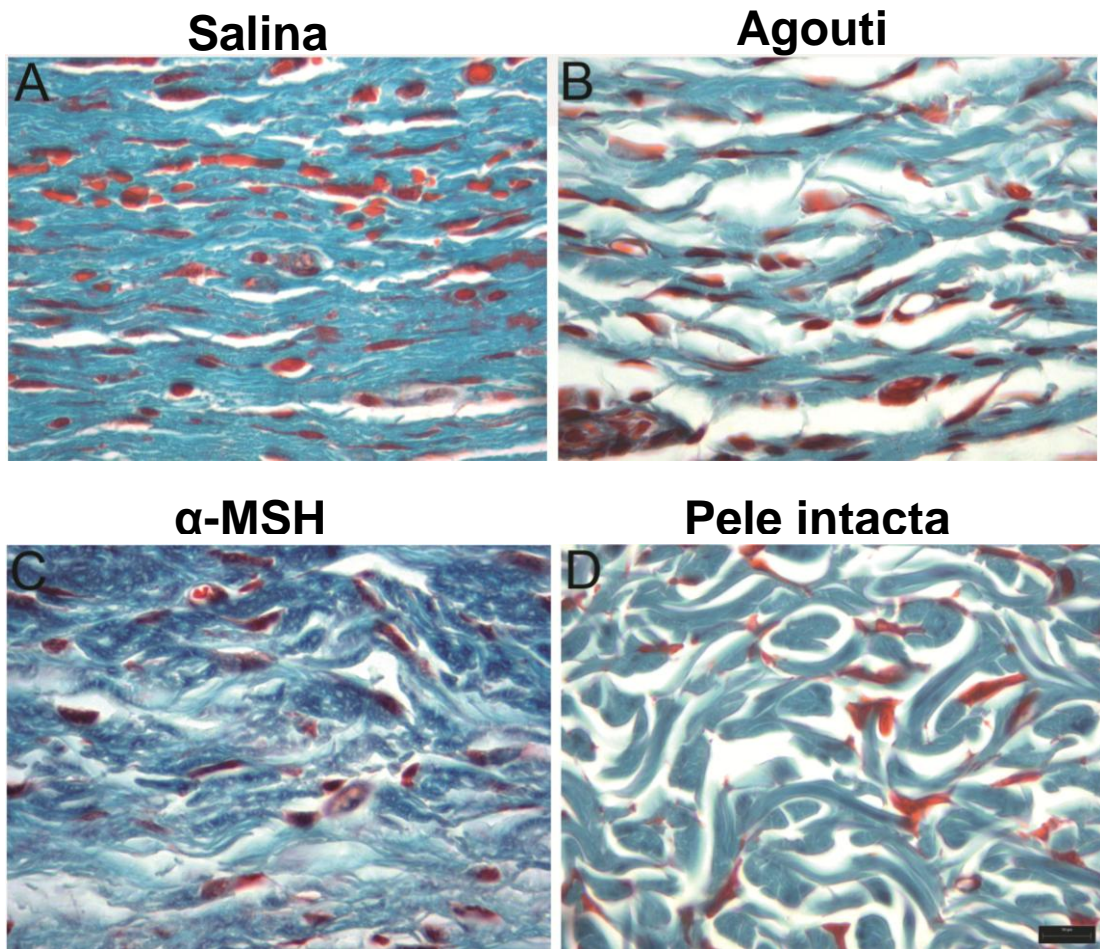


Figura 13 – Injeção de 1,0 mg/kg de α -MSH melhora a deposição das fibras de colágeno 40 dias após realização da lesão . Aspecto histológico da área de cicatriz 40 dias após realização da lesão + injeção de salina (A), lesão + injeção de agouti (B), lesão + injeção de α -MSH (C), pele intacta (D). Coloração tricromático de gômori. Magnificação original das microfotografias (A-B-C-D) 1000x; escala da barra (A-B-C-D) = 20 μ m.

Assim como mostrado macroscopicamente, a determinação microscópica da área de cicatriz 40 dias após a lesão foi significativamente reduzida no grupo injetado com 1,0 mg/kg de α -MSH, figuras 12 e 14, quando comparado com os grupos injetados com salina ou 125 mg/kg da proteína agouti.

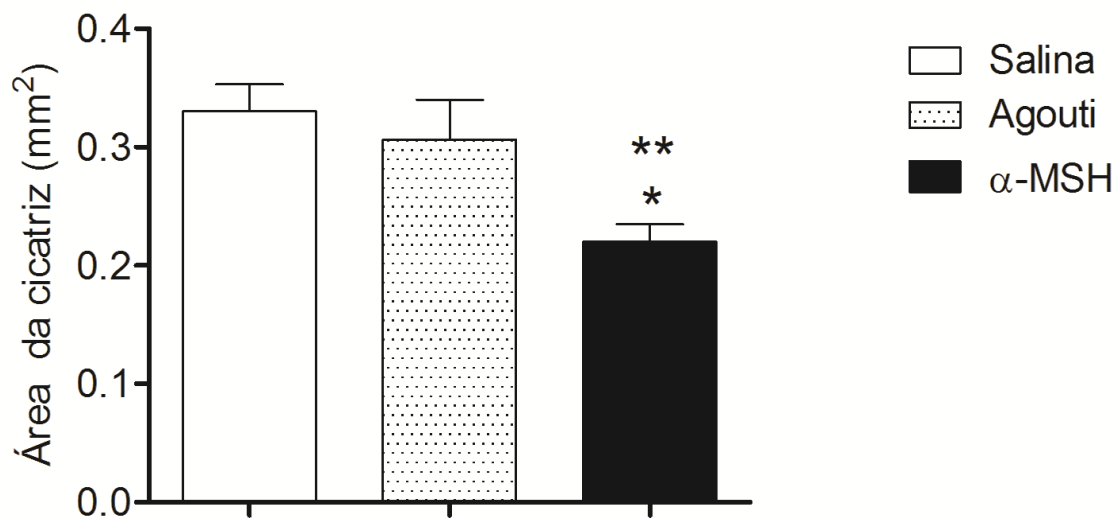


Figura 14 - Injeção de 1,0 mg/kg de α -MSH reduz a área de cicatriz, medida microscópica, 40 dias após realização da ferida. Medida microscópica da área da cicatriz 40 dias após a lesão + salina (barra branca), lesão +agouti (barra pontilhada) e lesão + α -MSH (barra preta). Dados representam média \pm erro padrão, * $p \leq 0,05$ α -MSH é significativamente menor que o grupo salina, ** $p \leq 0,05$ α -MSH é significativamente menor que o grupo agouti.

5.7 – Avaliação da intensidade de fluorescência e disposição das fibras colágenas do tipo I e III 40 dias após realização da lesão e injeção de α -MSH.

A análise histopatológica das imagens coradas com tricromático de Gômori demonstrou a ocorrência de uma melhor deposição de fibras colágenas no grupo α -MSH. Logo, uma análise mais detalhada das fibras de colágeno I e III foi realizada. Para isso, as feridas coletadas, 40 dias após sua realização e fixadas em DMSO/Metanol, foram submetidas às etapas de preparação da técnica de imunofluorescência, como descrito em materiais e métodos.

Embora a intensidade de fluorescência para colágeno I seja semelhante entre os grupos, figura 15G, a disposição das fibras não é igual. As fibras presentes no grupo salina,

figura 15B, são mais longas, mais delgadas e mais compactadas quando comparadas com as da pele intacta, figura 15A, além de estarem dispostas paralelamente entre si. O grupo α -MSH, figura 15C, apresenta características intermediárias, sendo o que mais se assemelha ao grupo pele intacta, uma vez que apresenta fibras mais espessas e emaranhadas quando comparado ao grupo salina.

Com relação ao colágeno III, o grupo α -MSH apresentou uma intensidade de colágeno III significativamente maior que os outros grupos, figura 16G. As fibras de colágeno III no grupo α -MSH, figura 16C, também apresentam características intermediárias, sendo mais espessas e emaranhadas, quando comparadas às do grupo salina, figura 16B, e por isso mais semelhantes às da pele intacta, figura 16A.

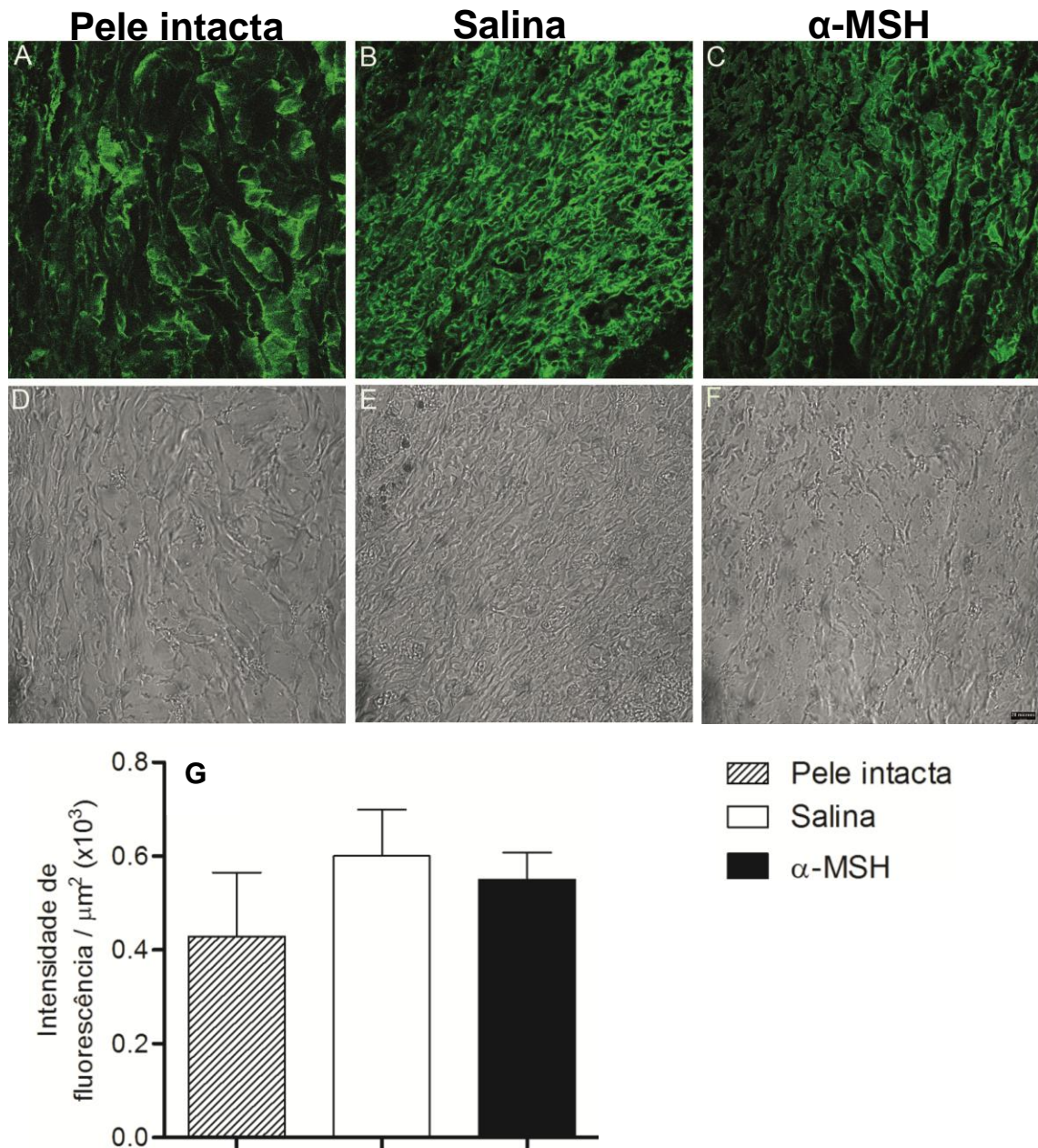


Figura 15 - Injeção de 1,0 mg/kg de α -MSH não altera a intensidade de colágeno I presente na área de cicatriz 40 dias após realização da ferida. Imunofluorescência com anticorpos anti-colágeno I em animais representativos de um dos grupos pele intacta (A), lesão + injeção de salina (B), lesão + injeção de α -MSH (C). Intensidade de fluorescência (G) para colágeno I realizada em pele intacta (barra com linhas diagonais) ou 40 dias após a realização da lesão + injeção de salina (barra branca), lesão + injeção de α -MSH (barra preta). As imagens representadas em D-F são correspondentes às imagens A-C, antes da excitação pelo laser. Dados representam a média \pm erro padrão. Barra de escala = 20 μm .

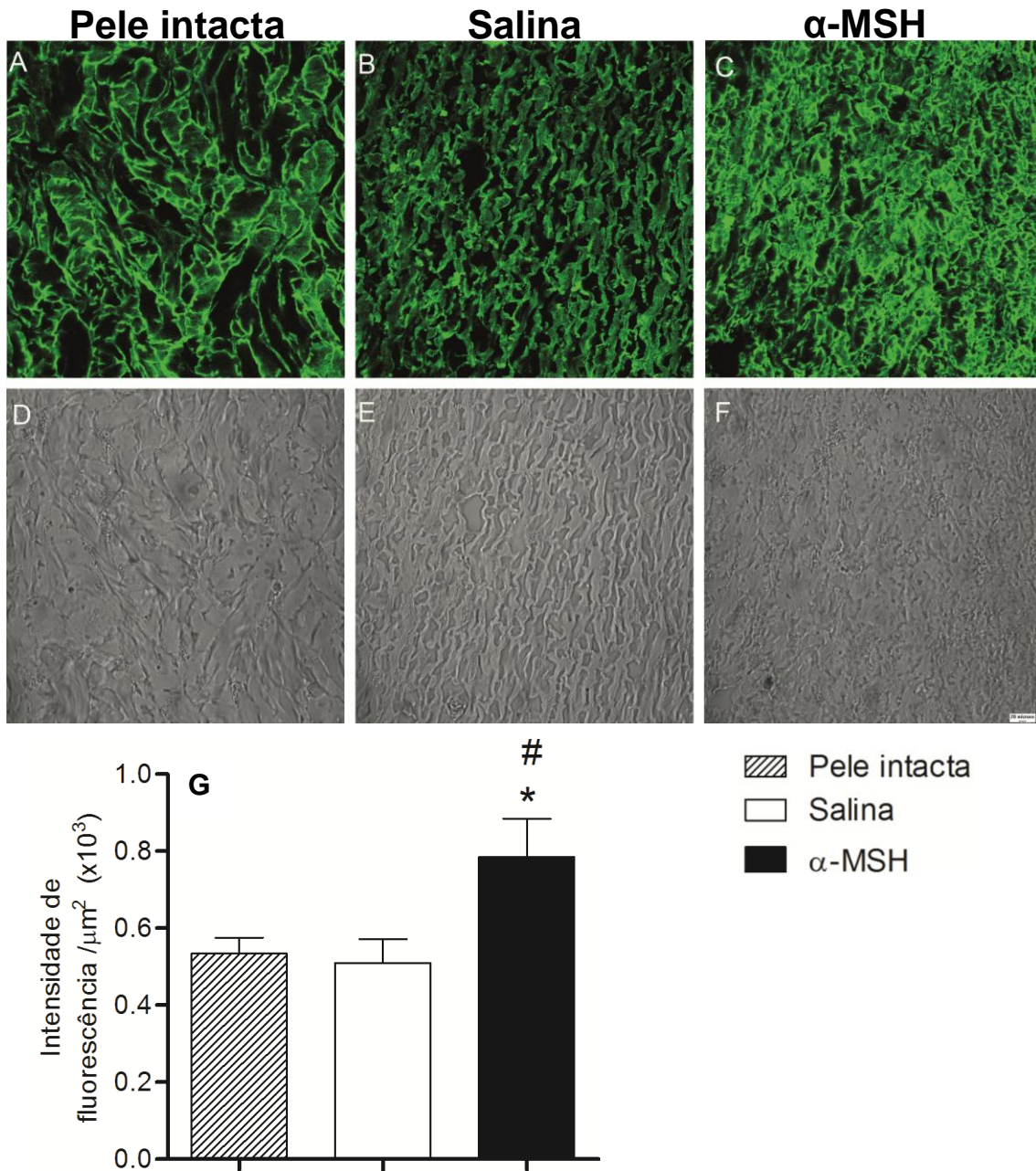


Figura 16: Injeção de 1,0 mg/kg de α -MSH aumenta a intensidade de fluorescência e altera a disposição das fibras colágenas do tipo III na área de cicatriz 40 dias após realização da lesão. Imunofluorescência com anticorpos anti-colágeno III em animais representativos de um dos grupos pele intacta (A-D), lesão + salina (B-E), lesão + injeção de α -MSH (C-F). Intensidade de fluorescência para colágeno III realizada em pele intacta (barra com linhas diagonais) ou 40 dias após a realização da lesão + injeção de salina (barra branca), lesão + injeção de α -MSH (barra preta). As imagens representadas em D-F são correspondentes às imagens A-C, antes da excitação pelo laser. Dados representam a média \pm erro padrão, * $p \leq 0,05$ α -MSH é estatisticamente diferente do grupo pele intacta, # $p \leq 0,05$ α -MSH é estatisticamente diferente do grupo salina. Barra de escala = 20 μm

5.8 – Determinação do número de fibroblastos presentes na área de cicatriz 40 dias após realização da lesão e injeção de α -MSH ou proteína agouti.

Como o grupo injetado com o neuropeptídeo α -MSH apresentou uma maior deposição de colágeno III, figura 16, foi realizada a análise morfométrica para determinação do número de fibroblastos presentes na área de cicatriz 40 dias após a realização da lesão. Para isso foram contados dez áreas de $100 \mu\text{m}^2$ cada, em um corte histológico, com auxílio de um retículo, como descrito em materiais e métodos.

Aos 40 dias após a lesão o número de fibroblastos não apresentou uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos, figura 17

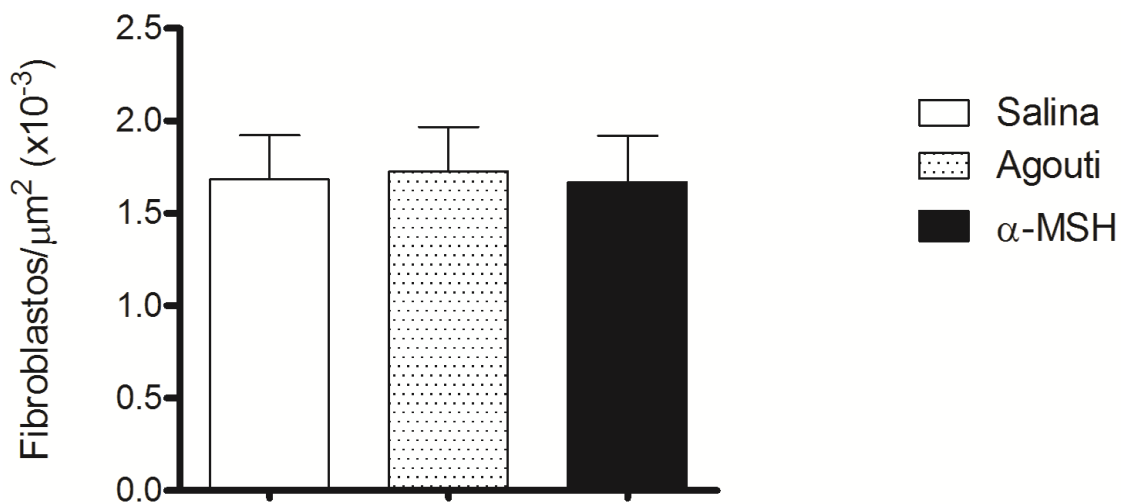


Figura 17 - Injeção de 1,0 mg/kg de α -MSH ou 125 mg/kg da proteína agouti não altera o número de fibroblastos na área de cicatriz 40 dias após a lesão. . Análise morfométrica do número de fibroblastos presentes na área de cicatriz 40 dias após a ferida nos grupos lesão + salina (barra branca), lesão + agouti (barra pontilhada) e lesão + α -MSH (barra preta). Dados representam média \pm erro padrão, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

5 – DISCUSSÃO

O peptídeo α -MSH apresenta uma intensa ação anti-inflamatória, demonstrada em vários modelos *in vivo* e *in vitro* que pode ser desencadeada através de vias neurogênicas descendentes ativadas por meio de sua ligação a receptores de melanocortinas localizados no sistema nervoso central, em células do sistema imune ou em outros órgãos (Brzoska *et al*, 2008). Na pele, a expressão de α -MSH e do seu receptor MC-1R foi demonstrada durante as fases iniciais do processo de cicatrização de feridas, tanto em queratinócitos quanto em células inflamatórias (Muffley *et al*, 2011). Entretanto o efeito da injeção deste peptídeo na cicatrização de lesões cutâneas ainda não havia sido avaliada. Como a dose de α -MSH utilizada em cada trabalho encontrado na literatura é muito variável, neste estudo foi necessário padronizar a dose de α -MSH a ser utilizada para avaliação de seus efeitos anti-inflamatórios durante do reparo de feridas de pele.

Hiltz and Lipton, em 1990, mostraram que a injeção *i.p.* de 1,0 mg/kg de α -MSH reduziu a inflamação aguda induzida pela injeção de carragenina na pata de camundongos. Aqui mostramos que a injeção de 1,0 mg/kg de α -MSH, por via *i.p.*, 30 minutos antes da realização das feridas cutâneas, reduziu significativamente o infiltrado leucocitário presente na área da lesão, figura 6. Além disso, assim como mostrado para o modelo de inflamação aguda (Hiltz and Lipton 1990), em nosso trabalho vimos que a injeção de 0,5 mg/kg de α -MSH não altera o número de células inflamatórias na área de reparo, figura 6. Por outro lado, Lipton e colaboradores, em 1991, demonstraram que doses inferiores a 0,5 mg/kg, administradas diretamente nos ventrículos cerebrais, eram capazes de inibir o edema na orelha de camundongos BALB/C induzido por cloreto de picrila (Lipton *et al*, 1991).

Os trabalhos *in vivo* desenvolvidos com o hormônio α -MSH são muito diversos no que diz respeito às vias de administração do referido neuropeptídeo. Várias vias, tais como intraperitoneal, endovenosa, intracerebroventricular, subcutânea, tópica, entre outras são descritas na literatura. Nós ainda não testamos o efeito da injeção de α -MSH no reparo das lesões cutâneas por outras vias diferentes da intraperitoneal, mas achamos que é também importante testar o efeito da administração tópica após a realização das feridas na pele.

Embora nos trabalhos de Hiltz and Lipton, em 1990, doses maiores que 1,0 mg/kg apresentaram resultados semelhantes à dose de 1,0 mg/kg, nos nossos experimentos a dose de 2,5 mg/kg de α -MSH não reduziu o número de células inflamatórias na área da lesão, figura 6. Este dado não é inesperado porque as ações de hormônios podem ocorrer em faixas de

concentrações ótimas, podendo inclusive haver um efeito de feedback negativo acima de determinadas concentrações (Walker *et al*, 2012). Por isso não avaliamos os outros parâmetros do processo de reparo utilizando doses maiores que 1 mg/kg de α -MSH.

Além de reduzir o infiltrado leucocitário no terceiro dia após a lesão o α -MSH também reduziu outros sinais inflamatórios como descrito em resultados. Os efeitos anti-inflamatórios desencadeados pelo peptídeo α -MSH podem ser provenientes da inibição da ativação do fator de transcrição NF- κ B (Manna and Aggarwal 1998), da produção de citocinas proinflamatórias (Bohm *et al*, 1999; Luger *et al*, 1993; Rajora *et al*, 1997), de mediadores inflamatórios, tais como prostaglandina (Nicolaou *et al*, 2004) e histamina (Adachi *et al*, 1999), bem como pela indução da expressão de citocinas supressoras, tal como IL-10 (Bhardwaj *et al*, 1997; Redondo *et al*, 1998). Além disso, já foi demonstrado que α -MSH suprime os níveis de expressão das moléculas de adesão E-selectina, VCAM (Kalden *et al*, 1999), ICAM-1 (Morandini *et al*, 1998). Essas alterações poderiam explicar a redução de células inflamatórias presentes na área da ferida.

Se a redução do infiltrado leucocitário desencadeado pela injeção de α -MSH está relacionada à inibição da secreção de citocinas ou quimiocinas ou se o hormônio altera a capacidade destas células aderirem, rolarem e transmigrarem pelo endotélio, bem como migrarem no espaço intersticial em direção ao foco da inflamação ainda não foi esclarecido. A análise da expressão de moléculas de adesão e de quimiocinas poderá ajudar a elucidar os mecanismos envolvidos neste efeito anti-inflamatório da injeção intraperitoneal de α -MSH em lesões cutâneas.

Em nosso trabalho, através da injeção de agouti 30 minutos antes da realização das feridas cutâneas, procuramos verificar se o bloqueio da ligação de α -MSH endógeno aos receptores MC-1R e/ou MC-4R teria um efeito pro-inflamatório. Nossos resultados não mostraram alteração significativa no número de leucócitos e de mastócitos no terceiro dia após a lesão, figuras 8 e 9. No entanto, como descrito nos resultados outros sinais inflamatórios estão aumentados em relação ao grupo controle, o qual recebeu injeção de salina antes da lesão. Assim, os resultados encontrados demonstram que a proteína agouti, injetada por via intraperitoneal, pode impedir a manifestação de alguns efeitos anti-inflamatórios de α -MSH. Seria interessante avaliar se a injeção de doses diferentes da proteína agouti pode modificar o número de leucócitos durante o reparo de lesões cutâneas.

Evidências da expressão de MC-3R e MC-5R em células do sistema imune, tais como macrófagos, linfócitos e mastócitos, sugerem que eles possam mediar alguns dos efeitos

anti-inflamatórios do α -MSH (Brzoska *et al*, 2008; Buggy 1998; Getting *et al*, 2003). Isto poderia explicar o motivo pelo qual o número de leucócitos e mastócitos encontrado no grupo injetado com a proteína agouti não é significativamente maior que os encontrado no grupo injetado com salina, porém informações sobre a expressão destes receptores durante do processo de reparo de feridas cutâneas são desconhecidas. Seria então interessante determinar quais dos receptores de melanocortinas apresentam uma expressão mais significativa para este modelo.

Grützkau e colaboradores, em 2000, demonstraram, *in vitro*, que o hormônio α -MSH é capaz de induzir a liberação de histamina em mastócitos purificados da pele humana, porém a liberação de algumas citocinas, tais como IL-1 β , TNF- α , e TGF- β , bem como de alguns fatores de transcrição, tais como NF κ B não foram detectados(Grutzkau *et al*, 2000). Contrariamente aos resultados de Grützkau e colaboradores, Adachi e colaboradores, em 1999, mostraram que α -MSH é capaz de inibir a liberação de histamina por mastócitos murinos em cultura. Assim, estudos mais detalhados são necessários para elucidar melhor a relação existente entre mastócitos e o hormônio α -MSH, principalmente em modelos *in vivo*.

Wulff e colaboradores, em 2012, demonstraram que em animais deficientes para mastócitos (Kit^{w/w-v}) há uma redução na formação de cicatriz, 7 e 10 dias após a realização da lesão. Além disso, estes mesmos autores mostraram que a pele de embriões de camundongos, no 15º dia de desenvolvimento, período no qual eles reparam sem a formação de cicatriz, contém um menor número de mastócitos/mm² que a pele de embriões no 18º dia de desenvolvimento, onde ocorre o reparo com cicatrização.

Uma vez que o reparo de feridas cutâneas em camundongos deficientes em mastócitos resultou na formação de uma menor área de cicatriz(Wulff *et al*, 2012) é provável que a redução do número de mastócitos encontrada no grupo injetado com o hormônio α -MSH possa ter contribuído diretamente para a redução da área de cicatriz observada 40 dias após a realização da lesão, figura 10.

A redução do número de macrófagos presentes na área da lesão, durante a fase inflamatória do processo de cicatrização de feridas, também resulta na redução da área de cicatriz(Lucas *et al*, 2010). Assim, seria interessante realizar uma análise diferencial do infiltrado leucocitário para se determinar se os efeitos anti-inflamatórios do α -MSH foram mais pronunciados em algum grupo de células.

Além da área da cicatriz outro aspecto que deve ser avaliado no processo de cicatrização é a composição e disposição das fibras da MEC. Embora o número de

fibroblastos, 3 dias após a realização da ferida, tenha se mantido semelhante para todos os grupos, uma diferença bem acentuada na deposição das fibras de colágeno pode ser observada 40 dias após a lesão, figura 11. As fibras colágenas depositadas na área de cicatriz do grupo controle injetado com salina são mais longas, delgadas e paralelas, já as presentes no grupo pele intacta são mais curtas, espessas e dispostas em forma de rede. As fibras encontradas no grupo α -MSH apresentam características intermediárias uma vez que são mais menores, mais espessas e emaranhadas, porém não apresentam-se tão definidas e nítidas quanto as encontradas na pele intacta, figuras 12, 13 e 14. O grupo agouti também apresentam fibras mais longas, finas e dispostas paralelamente a epiderme.

Embora não haja uma diferença significativa no número de fibroblastos 3 e 40 dias após a lesão, figuras 6 e 17, ou seja, na fase inflamatória e de remodelamento do processo de reparo, pode haver diferenças no estado de ativação destas células e, neste caso, a quantificação de fibroblastos pode não resultar em diferença estatisticamente significativa em qualquer momento do processo de reparo.

A comparação entre o reparo de feridas cutâneas em fetos e adultos, que pode levar a um fenótipo mais regenerativo ou de formação de cicatriz, respectivamente, mostra um grande número de diferenças nos vários estágios deste processo. Nas fases iniciais observa-se a formação de um intenso processo inflamatório, com altos níveis de neutrófilos, macrófagos e mastócitos em feridas de adultos, enquanto em fetos o processo inflamatório é mínimo. Além disso, a comparação da matriz extracelular formada na região das feridas de fetos e adultos mostra significativas diferenças em relação à morfologia e constituição das fibras colágenas. Enquanto fetos restauram o padrão de disposição das fibras colágenas encontrado nas regiões não lesadas, em adultos isto não é observado. Além disso, as feridas fetais apresentam maiores níveis de colágeno do tipo III, quando comparados as feridas de adultos (Leung *et al*, 2012). Embora alta, esta deposição de colágeno III não é excessiva, o que pode ser explicado por um rápido *turnover* dos componentes presentes na MEC (Rolfé and Grobbelaar 2012). O colágeno I é o tipo predominante tanto em fetos quanto em adultos, porém a pele reparada em fetos apresenta uma relação colágeno III/I maior que a região de cicatriz em adultos (Namazi *et al*, 2011).

Em nossos resultados mostramos que a arquitetura das fibras colágenas presentes no grupo α -MSH apresenta alterações quando comparadas as encontradas no grupo salina. No primeiro elas encontram-se mais curtas, espessas e entrelaçadas, indicando que este hormônio proporciona uma melhora no arranjo da matriz extracelular. Além disso, o grupo que recebeu

α -MSH apresenta uma quantidade de colágeno III maior que a encontrada na própria pele intacta, o que pode ser interpretado de duas maneiras: primeira, o hormônio α -MSH melhora o processo de reparo de tal maneira que restaura, parcialmente, o padrão encontrado na pele de fetos. Neste sentido todos os benefícios relacionados à deposição de fibras colágenas do tipo I seriam mantidos, uma vez que a quantidade desta fibra não foi alterada entre os grupos. Segunda, a maior quantidade de fibras colágenas do tipo III na área de reparo de indivíduos do grupo α -MSH pode refletir uma imaturidade da matriz extracelular relacionada a uma alteração da cinética de remodelamento o que indica a necessidade de analisar a região em um período posterior.

Alguns trabalhos têm proposto que o peptídeo α -MSH apresenta uma atividade antifibrótica. Bohm e colaboradores, em 2004, mostraram que o peptídeo α -MSH é capaz de reduzir a produção de colágeno I induzida na pele de camundongos Balb/c pela injeção de TGF- β , 4 dias após a injeção do mesmo. Além disso, Kokot e colaboradores, em 2009, demonstram que o α -MSH suprime a síntese de colágeno I e III induzida por bleomicina, *in vitro* e colágeno I *in vivo*, usando o modelo de escleroderma, 3 semanas após sua indução.

Nossos resultados não mostraram alterações na quantidade de colágeno I, diferentemente do que foi relatado em alguns trabalhos encontrados na literatura. Porém, nestes existem muitas variações com relação aos modelos usados para o estudo, às vias de administração, à idade dos animais e ao período de análise do efeito da administração de α -MSH. Nos trabalhos de Böhm e colaboradores (Böhm 2004), foram utilizados animais recém-nascidos e a síntese de colágeno foi avaliada apenas 4 dias após a injeção TGF- β . Neste mesmo trabalho, os autores afirmam que o conteúdo de hidroxiprolina não pode ser realizado por se encontrar abaixo do limite de detecção, ao contrário do que é encontrado para animais adultos. Da mesma forma os trabalhos de Kokot e colaboradores utilizaram animais mais jovens, com seis semanas de idade e avaliaram, *in vivo*, apenas a quantidade de colágeno I, 3 semanas após a indução do modelo de escleroderma.

A idade influencia de maneira direta o reparo de feridas, principalmente no que diz respeito à constituição da nova matriz extracelular (Whitby and Ferguson 1991). Além disso, o processo de cicatrização de feridas apresenta fases nas quais eventos marcadamente diferentes acontecem e influenciam diretamente os resultados observados em momentos determinados.

Os resultados aqui apresentados sobre a deposição de colágeno foram obtidos a partir da realização de feridas em animais adultos, as quais foram analisadas em um período mais

avanzado do processo de reparo, 40 dias após realização das mesmas. Além disso, a afirmação de que o α -MSH apresenta características antifibrogênicas nos modelos *in vivo* foi baseada apenas na quantificação de fibras colágenas do tipo I. Enquanto que nossos resultados apresentam uma análise morfológica da arquitetura das fibras de colágeno I e III, bem como a quantificação de ambas.

Um outro aspecto que ainda deve ser considerado é que 40 dias após a realização das lesões, todos os grupos apresentavam um fechamento completo das áreas. Porém se há uma diferença na velocidade de fechamento entre o período de 3 a 40 dias, ainda precisa ser determinado.

Assim, os resultados e discussões aqui expostos demonstram que o neuropeptídeo α -MSH é capaz de melhorar o processo de reparo de feridas cutâneas realizadas em camundongos C57BL/6 adultos, além de fornecer novos direcionamentos e questionamentos para o estudo do processo de reparo de feridas e sua relação com os sistemas nervoso, imune e endócrino, o chamado sistema neuroimunoendócrino. Seria interessante investigar se a aplicação de α -MSH posteriormente à realização da lesão, bem como repetidas vezes, resultaria em eventos anti-inflamatórios semelhantes, mais ou menos intensos que os observados. Mais interessante ainda seria descobrir se a injeção de α -MSH em animais diabéticos apresenta efeitos similares, melhorando a cicatrização.

7 – CONCLUSÕES

A injeção de 1,0 mg/kg do neuropeptídeo α -MSH diminuiu o processo inflamatório ocorrido durante as fases iniciais do reparo de feridas cutâneas reduzindo, 40 dias depois, a extensão da área de cicatriz e aumentando a deposição de colágeno III.

A injeção de 125 mg/kg da proteína agouti não bloqueou completamente os efeitos anti-inflamatórios do peptídeo α -MSH endógeno, mas alterou o padrão de deposição de fibras colágenas, resultando na formação de uma matriz extracelular mais frouxa.

8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADACHI, S., NAKANO, T., VLIAGOFTIS, H. and METCALFE, D. D. (1999). "Receptor-mediated modulation of murine mast cell function by alpha-melanocyte stimulating hormone." **Journal of Immunology** 163(6): 3363-3368.
- ARMSTRONG, J. R. and FERGUSON, M. W. (1995). "Ontogeny of the skin and the transition from scar-free to scarring phenotype during wound healing in the pouch young of a marsupial, *Monodelphis domestica*." **Developmental Biology** 169(1): 242-260.
- AURIEMMA, M., BRZOSKA, T., KLENNER, L., KUPAS, V., GOERGE, T., VOSKORT, M., ZHAO, Z., SPARWASSER, T., LUGER, T. A. and LOSER, K. (2012). "alpha-MSH-stimulated tolerogenic dendritic cells induce functional regulatory T cells and ameliorate ongoing skin inflammation." **Journal of Investigative Dermatology** 132(7): 1814-1824.
- BECHER, E., MAHNKE, K., BRZOSKA, T., KALDEN, D. H., GRABBE, S. and LUGER, T. A. (1999). "Human peripheral blood-derived dendritic cells express functional melanocortin receptor MC-1R." **Annals of the New York Academy of Sciences** 885: 188-195.
- BENJANNET, S., RONDEAU, N., DAY, R., CHRETIEN, M. and SEIDAH, N. G. (1991). "PC1 and PC2 are proprotein convertases capable of cleaving proopiomelanocortin at distinct pairs of basic residues." **Proceedings of the National Academy of Sciences** 88(9): 3564-3568.
- BENSOUILAH, J., BUCK, P., TISSERAND, R. and AVIS, A. (2006). **Aromadermatology: Aromatherapy in the Treatment and Care of Common Skin Conditions**, Radcliffe Publishing Ltd. 249p.
- BHARDWAJ, R., BECHER, E., MAHNKE, K., HARTMEYER, M., SCHWARZ, T., SCHOLZEN, T. and LUGER, T. A. (1997). "Evidence for the differential expression of the functional alpha-melanocyte-stimulating hormone receptor MC-1 on human monocytes." **Journal of Immunology** 158(7): 3378-3384.

- BIELEFELD, K. A., AMINI-NIK, S. and ALMAN, B. A. (2012). "Cutaneous wound healing: recruiting developmental pathways for regeneration." **Cellular and Molecular Life Sciences**. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-012-1152-9> %I >. Acesso em: 13 de Janeiro de 2013
- BOHM, M., APEL, M., SUGAWARA, K., BREHLER, R., JURK, K., LUGER, T. A., HAAS, H., PAUS, R., EIZ-VESEPER, B., WALLS, A. F., PONIMASKIN, E., GEHRING, M., KAPP, A. and RAAP, U. (2012). "Modulation of basophil activity: a novel function of the neuropeptide alpha-melanocyte-stimulating hormone." **Journal of Allergy and Clinical Immunology** 129(4): 1085-1093.
- BOHM, M., LUGER, T. A., TOBIN, D. J. and GARCIA-BORRÓN, J. C. (2006). "Melanocortin receptor ligands: new horizons for skin biology and clinical dermatology." **Journal of Investigative Dermatology** 126(9): 1966-1975.
- BOHM, M., METZE, D., SCHULTE, U., BECHER, E., LUGER, T. A. and BRZOSKA, T. (1999). "Detection of melanocortin-1 receptor antigenicity on human skin cells in culture and in situ." **Experimental Dermatology** 8(6): 453-461.
- BÖHM, M. R., M; SUNDERKÖTTER, C; SCHILLER, M; STÄNDER, S; BRZOSKA, T; CAUVET, T; SCHIÖTH, H.B, SCHWARZ, T; LUGER, T. (2004). "Collagen Metabolism Is a Novel Target of the Neuropeptide alpha-Melanocyte-stimulating Hormone." **The Journal of Biological Chemistry** 279(8): 6959-6966.
- BROD, S. A. and HOOD, Z. M. (2008). "Ingested (oral) alpha-MSH inhibits acute EAE." **Journal of Neuroimmunology** 193(1-2): 106-112.
- BRODELL, L. A. and ROSENTHAL, K. S. (2008). "Skin Structure and Function - The Body's Primary Defense Against Infection." **Infectious Diseases in Clinical Practice** 16(2): 113-117.
- BRZOSKA, T., LUGER, T. A., MAASER, C., ABELS, C. and BOHM, M. (2008). "Alpha-melanocyte-stimulating hormone and related tripeptides: biochemistry, antiinflammatory and protective effects in vitro and in vivo, and future perspectives for the treatment of immune-mediated inflammatory diseases." **Endocrine Reviews** 29(5): 581-602.

- BUGGY, J. J. (1998). "Binding of alpha-melanocyte-stimulating hormone to its G-protein-coupled receptor on B-lymphocytes activates the Jak/STAT pathway." **Biochem J** 331 (Pt 1): 211-216.
- BULTMAN, S. J., MICHAUD, E. J. and WOYCHIK, R. P. (1992). "Molecular characterization of the mouse agouti locus." **Cell** 71(7): 1195-1204.
- CATANIA, A. and LIPTON, J. M. (1993). "alpha-Melanocyte stimulating hormone in the modulation of host reactions." **Endocrine Reviews** 14(5): 564-576.
- CATANIA, A., RAJORA, N., CAPSONI, F., MINONZIO, F., STAR, R. A. and LIPTON, J. M. (1996). "The neuropeptide alpha-MSH has specific receptors on neutrophils and reduces chemotaxis in vitro." **Peptides** 17(4): 675-679.
- CHEN, W., KELLY, M. A., OPITZ-ARAYA, X., THOMAS, R. E., LOW, M. J. and CONE, R. D. (1997). "Exocrine gland dysfunction in MC5-R-deficient mice: evidence for coordinated regulation of exocrine gland function by melanocortin peptides." **Cell** 91(6): 789-798.
- CLARK, R. A. (1990). "Fibronectin matrix deposition and fibronectin receptor expression in healing and normal skin." **Journal of Investigative Dermatology** 94(6 Suppl): 128S-134S.
- COOPER, A., ROBINSON, S. J., PICKARD, C., JACKSON, C. L., FRIEDMANN, P. S. and HEALY, E. (2005). "Alpha-melanocyte-stimulating hormone suppresses antigen-induced lymphocyte proliferation in humans independently of melanocortin 1 receptor gene status." **Journal of Immunology** 175(7): 4806-4813.
- COWIN, A. J., BROSNAN, M. P., HOLMES, T. M. and FERGUSON, M. W. (1998). "Endogenous inflammatory response to dermal wound healing in the fetal and adult mouse." **Developmental Dynamics** 212(3): 385-393.
- SBCP. (2009). Cirurgia plástica no Brasil. **Sociedade Brasileira de Cirurgia Plástica e Instituto de pesquisa Datafolha**. Disponível em: <www2.cirurgiaplastica.org.br/wp-content/uploads/2012/11/pesquisa2009.pdf>. Acesso em: 26de Março de 2013.

- DARWIN, C. (2000). **A expressão das emoções no homem e nos animais**. São Paulo: Companhia das Letras. (Trabalho original publicado em 1872). 384 p.
- DAYNES, R. A., ROBERTSON, B. A., CHO, B. H., BURNHAM, D. K. and NEWTON, R. (1987). "Alpha-melanocyte-stimulating hormone exhibits target cell selectivity in its capacity to affect interleukin 1-inducible responses in vivo and in vitro." **Journal of Immunology** 139(1): 103-109.
- DESMOULIERE, A., REDARD, M., DARBY, I. and GABBIANI, G. (1995). "Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar." **American Journal of Pathology** 146(1): 56-66.
- DRESDEN, M.H. and Moses, R.E. (1973). "Denervation effects on Newt limb regeneration: DNA polymerase activity in vitro." **Developmental Biology** 34: 346-350.
- DINULESCU, D. M. and CONE, R. D. (2000). "Agouti and agouti-related protein: analogies and contrasts." **The Journal of Biological Chemistry** 275(10): 6695-6698.
- EVES, P. C., MACNEIL, S. and HAYCOCK, J. W. (2006). "alpha-Melanocyte stimulating hormone, inflammation and human melanoma." **Peptides** 27(2): 444-452.
- FFRENCH-CONSTANT, C., VAN DE WATER, L., DVORAK, H. F. and HYNES, R. O. (1989). "Reappearance of an embryonic pattern of fibronectin splicing during wound healing in the adult rat." **The Journal of Cell Biology** 109(2): 903-914.
- GARTNER, L. P. and HIATT, J. L. (2007). **Tratado de histologia em cores**. Rio de Janeiro, Elsevier. 576p.
- GAWRONSKA-KOZAK, B., BOGACKI, M., RIM, J. S., MONROE, W. T. and MANUEL, J. A. (2006). "Scarless skin repair in immunodeficient mice." **Wound Repair Regen** 14(3): 265-276.

- GETTING, S. J., CHRISTIAN, H. C., LAM, C. W., GAVINS, F. N., FLOWER, R. J., SCHIOTH, H. B. and PERRETTI, M. (2003). "Redundancy of a functional melanocortin 1 receptor in the anti-inflammatory actions of melanocortin peptides: studies in the recessive yellow (e/e) mouse suggest an important role for melanocortin 3 receptor." **Journal of Immunology** 170(6): 3323-3330.
- GRUTZKAU, A., HENZ, B. M., KIRCHHOF, L., LUGER, T. and ARTUC, M. (2000). "alpha-Melanocyte stimulating hormone acts as a selective inducer of secretory functions in human mast cells." **Biochem Biophys Res Commun** 278(1): 14-19.
- GURTNER, G. C., WERNER, S., BARRANDON, Y. and LONGAKER, M. T. (2008). "Wound repair and regeneration." **Nature** 453(7193): 314-321.
- HARVEY, S., ARAMBURO, C. and SANDERS, E. J. (2012). "Extrapituitary production of anterior pituitary hormones: an overview." **Endocrine** 41(1): 19-30.
- HILL, R. P., MACNEIL, S. and HAYCOCK, J. W. (2006). "Melanocyte stimulating hormone peptides inhibit TNF-alpha signaling in human dermal fibroblast cells." **Peptides** 27(2): 421-430.
- HILTZ, M. E. and LIPTON, J. M. (1990). "Alpha-MSH peptides inhibit acute inflammation and contact sensitivity." **Peptides** 11(5): 979-982.
- HINZ, B. (2007). "Formation and function of the myofibroblast during tissue repair." **Journal of Investigative Dermatology** 127(3): 526-537.
- HOCKING, A. N., MUFFLEY, L. A. and GIBRAN, N. S. (2010). Neuroinflammatory Modulation of Cutaneous Responses to Injury. **Advances in Wound Care** C. K. Sen: 640.
- HOPKINSON-WOOLLEY, J., HUGHES, D., GORDON, S. and MARTIN, P. (1994). "Macrophage recruitment during limb development and wound healing in the embryonic and foetal mouse." **Journal of Cell Science** 107 (Pt 5): 1159-1167.

- HOYER, D. and BARTFAI, T. (2012). "Neuropeptides and neuropeptide receptors: drug targets, and Peptide and non-Peptide ligands: a tribute to prof. Dieter Seebach." **Chemistry & Biodiversity** 9(11): 2367-2387.
- ISAPS. (2010). ISAPS International Survey on aesthetic/Cosmetic Procedures Performed in 2010. Disponível em: <www.isaps.org/.../ISAPS-Procedures-Study-Result> Acesso em: 26 de Março de 2013
- JAHOVIC, N., ARBAK, S., TEKELI, O. and ALICAN, I. (2004). "Alpha-melanocyte stimulating hormone has beneficial effects on cerulein-induced acute pancreatitis." **Peptides** 25(1): 129-132.
- JUQUEIRA, L. C. and CARNEIRO, J. (2004). **Histologia Básica**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan S.A. 488p.
- KALDEN, D. H., SCHOLZEN, T., BRZOSKA, T. and LUGER, T. A. (1999). "Mechanisms of the antiinflammatory effects of alpha-MSH. Role of transcription factor NF-kappa B and adhesion molecule expression." **Annals of the New York Academy of Sciences** 885: 254-261.
- KIEFER, L. L., VEAL, J. M., MOUNTJOY, K. G. and WILKISON, W. O. (1998). "Melanocortin receptor binding determinants in the agouti protein." **Biochemistry** 37(4): 991-997.
- KING, M.W., NGUYEN, T., CALLEY, J., HARTY, M.W., MUZINICH, M.C., MESCHER, A.L., CHALFANT, C., N'Cho, M., McLEASTER, K., McENTIRE, J., STOCUM, D., SMITH, R.C. and NEFF, A.W. (2003) Identification of genes expressed during *Xenopus laevis* limb regeneration by using subtractive hybridization. **Developmental dynamics** 226:398-409.
- KOKOT, A., SINDRILARU, A., SCHILLER, M., SUNDERKOTTER, C., KERKHOFF, C., ECKES, B., SCHARFFETTER-KOCHANNEK, K., LUGER, T. A. and BOHM, M. (2009). "alpha-melanocyte-stimulating hormone suppresses bleomycin-induced collagen synthesis and reduces tissue fibrosis in a mouse model of scleroderma: melanocortin peptides as a novel treatment strategy for scleroderma?" **Arthritis & Rheumatism** 60(2): 592-603.

- KWON, H. Y., BULTMAN, S. J., LOFFLER, C., CHEN, W. J., FURDON, P. J., POWELL, J. G., USALA, A. L., WILKISON, W., HANSMANN, I. and WOYCHIK, R. P. (1994). "Molecular structure and chromosomal mapping of the human homolog of the agouti gene." **Proceedings of the National Academy of Sciences** 91(21): 9760-9764.
- LEUNG, A., CROMBLEHOLME, T. M. and KESWANI, S. G. (2012). "Fetal wound healing: implications for minimal scar formation." **Current Opinion in Pediatrics** 24(3): 371-378.
- LIPTON, J. M. and CATANIA, A. (1997). "Anti-inflammatory actions of the neuroimmunomodulator alpha-MSH." **Immunology Today** 18(3): 140-145.
- LIPTON, J. M., MACALUSO, A., HILTZ, M. E. and CATANIA, A. (1991). "Central administration of the peptide alpha-MSH inhibits inflammation in the skin." **Peptides** 12(4): 795-798.
- LOTTI, T., HAUTMANN, G. and PANCONESI, E. (1995). "Neuropeptides in skin." **Journal of the American Academy of Dermatology** 33(3): 482-496.
- LU, D., WILLARD, D., PATEL, I. R., KADWELL, S., OVERTON, L., KOST, T., LUTHER, M., CHEN, W., WOYCHIK, R. P., WILKISON, W. O. and ET AL. (1994). "Agouti protein is an antagonist of the melanocyte-stimulating-hormone receptor." **Nature** 371(6500): 799-802.
- LUCAS, T., WAISMAN, A., RANJAN, R., ROES, J., KRIEG, T., MULLER, W., ROERS, A. and EMING, S. A. (2010). "Differential roles of macrophages in diverse phases of skin repair." **Journal of Immunology** 184(7): 3964-3977.
- LUGER, T. A. (2002). "Neuromediators--a crucial component of the skin immune system." **Journal of Dermatological Science** 30(2): 87-93.
- LUGER, T. A. and BRZOSKA, T. (2007). "alpha-MSH related peptides: a new class of anti-inflammatory and immunomodulating drugs." **Annals of the Rheumatic Diseases** 66 Suppl 3: iii52-55.

- LUGER, T. A., BRZOSKA, T., SCHOLZEN, T. E., KALDEN, D. H., SUNDERKOTTER, C., ARMSTRONG, C. and ANSEL, J. (2000). "The role of alpha-MSH as a modulator of cutaneous inflammation." **Annals of the New York Academy of Sciences** 917: 232-238.
- LUGER, T. A., SCHAUER, E., TRAUTINGER, F., KRUTMANN, J., ANSEL, J., SCHWARZ, A. and SCHWARZ, T. (1993). "Production of immunosuppressing melanotropins by human keratinocytes." **Annals of the New York Academy of Sciences** 680: 567-570.
- LUGER, T. A., SCHOLZEN, T. and GRABBE, S. (1997). "The role of alpha-melanocyte-stimulating hormone in cutaneous biology." **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings** 2(1): 87-93.
- MAASER, C., KANNENGIESSER, K. and KUCHARZIK, T. (2006). "Role of the melanocortin system in inflammation." **Annals of the New York Academy of Sciences** 1072: 123-134.
- MANNA, S. K. and AGGARWAL, B. B. (1998). "Alpha-melanocyte-stimulating hormone inhibits the nuclear transcription factor NF-kappa B activation induced by various inflammatory agents." **Journal of Immunology** 161(6): 2873-2880.
- MARTIN, L. W. and LIPTON, J. M. (1990). "Acute phase response to endotoxin: rise in plasma alpha-MSH and effects of alpha-MSH injection." **American Journal of Physiology** 259(4 Pt 2): R768-772.
- MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, E., GALVÁN-HERNÁNDEZ, C.I., TOSCANO-MÁRQUEZ, B. and GUTIÉRREZ-OSPINA, G. Modulatory role of sensory innervation on hair follicle stem cell progeny during wound healing of the rat skin. **PLoS ONE** 7(5): e36421
- MCGRATH, J. A., EADY, R. A. J. and POPE, F. M. (2008). "Anatomy and Organization of Human Skin." **Rook's Textbook of Dermatology**: 45-128.
- MORANDINI, R., BOEYNAEMS, J. M., HEDLEY, S. J., MACNEIL, S. and GHANEM, G. (1998). "Modulation of ICAM-1 expression by alpha-MSH in human melanoma cells and melanocytes." **Journal of Cellular Physiology** 175(3): 276-282.

- MOULIN, V., LAWNY, F., BARRITAU, D. and CARUELLE, J. P. (1998). "Platelet releasate treatment improves skin healing in diabetic rats through endogenous growth factor secretion." **Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand)** 44(6): 961-971.
- MOUSTAFA, M., SZABO, M., GHANEM, G. E., MORANDINI, R., KEMP, E. H., MACNEIL, S. and HAYCOCK, J. W. (2002). "Inhibition of tumor necrosis factor- α stimulated NF κ B/p65 in human keratinocytes by alpha-melanocyte stimulating hormone and adrenocorticotrophic hormone peptides." **Journal of Investigative Dermatology** 119(6): 1244-1253.
- MUFFLEY, L. A., ZHU, K. Q., ENGRAV, L. H., GIBRAN, N. S. and HOCKING, A. M. (2011). "Spatial and temporal localization of the melanocortin 1 receptor and its ligand alpha-melanocyte-stimulating hormone during cutaneous wound repair." **Journal of Histochemistry & Cytochemistry** 59(3): 278-288.
- NAMAZI, M. R., FALLAHZADEH, M. K. and SCHWARTZ, R. A. (2011). "Strategies for prevention of scars: what can we learn from fetal skin?" **International Journal of Dermatology** 50(1): 85-93.
- NEUMANN ANDERSEN, G., NAGAEVA, O., MANDRIKA, I., PETROVSKA, R., MUCENIECE, R., MINCHEVA-NILSSON, L. and WIKBERG, J. E. (2001). "MC(1) receptors are constitutively expressed on leucocyte subpopulations with antigen presenting and cytotoxic functions." **Clinical & Experimental Immunology** 126(3): 441-446.
- NICOLAOU, A., ESTDALE, S. E., TSATMALI, M., HERRERO, D. P. and THODY, A. J. (2004). "Prostaglandin production by melanocytic cells and the effect of α -melanocyte stimulating hormone." **FEBS letters** 570(1): 223-226.
- OKTAR, B. K., YUKSEL, M. and ALICAN, I. (2004). "The role of cyclooxygenase inhibition in the effect of alpha-melanocyte-stimulating hormone on reactive oxygen species production by rat peritoneal neutrophils." **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids** 71(1): 1-5.

- OLLMANN, M. M., WILSON, B. D., YANG, Y. K., KERNS, J. A., CHEN, Y., GANTZ, I. and BARSH, G. S. (1997). "Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein." **Science** 278(5335): 135-138.
- PAGNANO, L. O., BARALDI-ARTONI, S. M., PACHECO, M. R. and OLIVERIA, D. (2009). "Aspectos básicos do processo cicatricial e fatores gerais relacionados com a reparação tecidual." **Revista científica eletrônica de medicina veterinária** 12: 1-18.
- RAAP, U., BRZOSKA, T., SOHL, S., PATH, G., EMMEL, J., HERZ, U., BRAUN, A., LUGER, T. and RENZ, H. (2003). "Alpha-melanocyte-stimulating hormone inhibits allergic airway inflammation." **Journal of Immunology** 171(1): 353-359.
- RAJORA, N., BOCCOLI, G., BURNS, D., SHARMA, S., CATANIA, A. P. and LIPTON, J. M. (1997). "alpha-MSH modulates local and circulating tumor necrosis factor-alpha in experimental brain inflammation." **The Journal of Neuroscience** 17(6): 2181-2186.
- REDONDO, P., GARCIA-FONCILLAS, J., OKROUJNOV, I. and BANDRES, E. (1998). "Alpha-MSH regulates interleukin-10 expression by human keratinocytes." **Archives of Dermatological Research** 290(8): 425-428.
- ROLFE, K. J. and GROBBELAAR, A. O. (2012). "A review of fetal scarless healing." **ISRN Dermatology** 2012: 698034.
- ROOSTERMAN, D., GOERGE, T., SCHNEIDER, S. W., BUNNETT, N. W. and STEINHOFF, M. (2006). "Neuronal control of skin function: the skin as a neuroimmunoendocrine organ." **Physiological Reviews** 86(4): 1309-1379.
- RUBIN, E., GORSTEIN, F., RUBIN, R., SCHAWARTING, R. and STRAYER, D. (2006). "**Patologia: bases clinicopatológicas da medicina.** ." Guanabara Koogan. 1625p.
- SATISH, L. and KATHJU, S. (2010). "Cellular and Molecular Characteristics of Scarless versus Fibrotic Wound Healing." **Dermatology Research and Practice** 2010: 790234, 1-11.

- SCHOLZEN, T., ARMSTRONG, C. A., BUNNETT, N. W., LUGER, T. A., OLERUD, J. E. and ANSEL, J. C. (1998). "Neuropeptides in the skin: interactions between the neuroendocrine and the skin immune systems." **Experimental Dermatology** 7(2-3): 81-96.
- SCHREML, S., SZEIMIES, R. M., PRANTL, L., LANDTHALER, M. and BABILAS, P. (2010). "Wound healing in the 21st century." **Journal of the American Academy of Dermatology** 63(5): 866-881.
- SCHULTZ, G. S., DAVIDSON, J. M., KIRSNER, R. S., BORNSTEIN, P. and HERMAN, I. M. (2011). "Dynamic reciprocity in the wound microenvironment." **Wound Repair and Regeneration** 19(2): 134-148.
- SEIDAH, N. G., BENJANNET, S., HAMELIN, J., MAMARBACHI, A. M., BASAK, A., MARCINKIEWICZ, J., MBIKAY, M., CHRETIEN, M. and MARCINKIEWICZ, M. (1999). "The subtilisin/kexin family of precursor convertases. Emphasis on PC1, PC2/7B2, POMC and the novel enzyme SKI-1." **Annals of the New York Academy of Sciences** 885: 57-74.
- SOO, C., BEANES, S. R., HU, F. Y., ZHANG, X., DANG, C., CHANG, G., WANG, Y., NISHIMURA, I., FREYMILLER, E., LONGAKER, M. T., LORENZ, H. P. and TING, K. (2003). "Ontogenetic transition in fetal wound transforming growth factor-beta regulation correlates with collagen organization." **American Journal of Pathology**, 163(6): 2459-2476.
- THODY, A. J., HUNT, G., DONATIEN, P. D. and TODD, C. (1993). "Human melanocytes express functional melanocyte-stimulating hormone receptors." **Annals of the New York Academy of Sciences** 680: 381-390.
- THODY, A. J., RIDLEY, K., PENNY, R. J., CHALMERS, R., FISHER, C. and SHUSTER, S. (1983). "MSH peptides are present in mammalian skin." **Peptides** 4(6): 813-816.
- VAN ZUIJLEN, P. P., RUURDA, J. J., VAN VEEN, H. A., VAN MARLE, J., VAN TRIER, A. J., GROENEVELT, F., KREIS, R. W. and MIDDELKOOP, E. (2003). "Collagen morphology in human skin and scar tissue: no adaptations in response to mechanical loading at joints." **Burns** 29(5): 423-431.

- WALKER, J. J., SPIGA, F., WAITE, E., ZHAO, Z., KERSHAW, Y., TERRY, J. R. and LIGHTMAN, S. L. (2012). "The origin of glucocorticoid hormone oscillations." **PLoS Biol** 10(6): e1001341.
- WHITBY, D. J. and FERGUSON, M. W. (1991). "The extracellular matrix of lip wounds in fetal, neonatal and adult mice." **Development** 112(2): 651-668.
- WILLARD, D. H., BODNAR, W., HARRIS, C., KIEFER, L., NICHOLS, J. S., BLANCHARD, S., HOFFMAN, C., MOYER, M., BURKHART, W., WEIEL, J. and ET AL. (1995). "Agouti structure and function: characterization of a potent alpha-melanocyte stimulating hormone receptor antagonist." **Biochemistry** 34(38): 12341-12346.
- WULFF, B. C., PARENT, A. E., MELESKI, M. A., DIPIETRO, L. A., SCHREMENTI, M. E. and WILGUS, T. A. (2012). "Mast cells contribute to scar formation during fetal wound healing." **Journal of Investigative Dermatology** 132(2): 458-465.
- YANG, Y. K., OLLMANN, M. M., WILSON, B. D., DICKINSON, C., YAMADA, T., BARSH, G. S. and GANTZ, I. (1997). "Effects of recombinant agouti-signaling protein on melanocortin action." **Molecular Endocrinology** 11(3): 274-280.